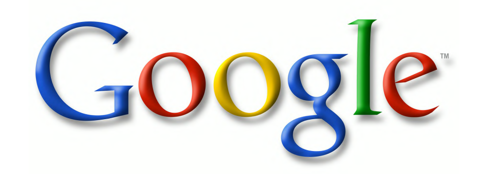
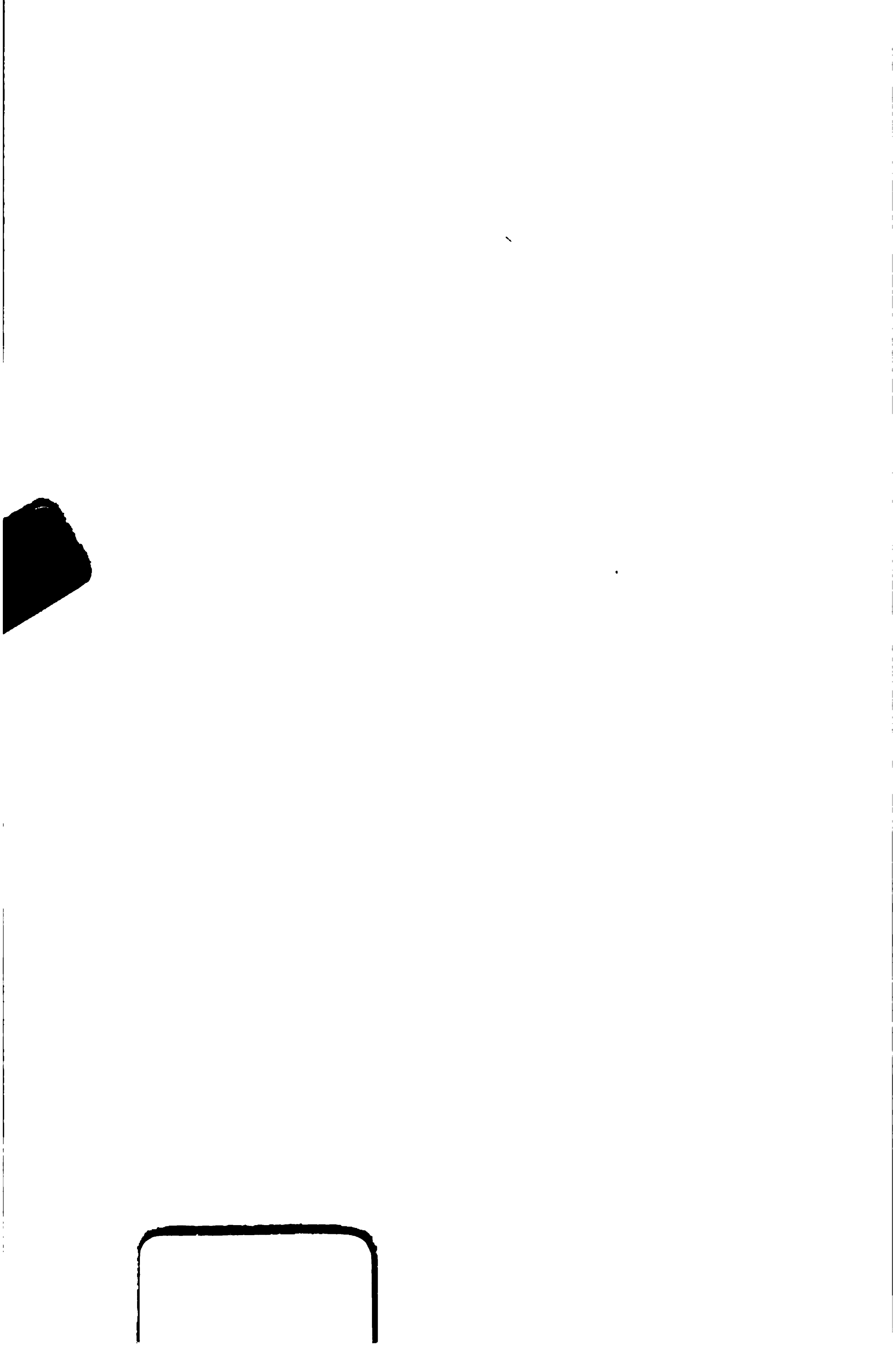
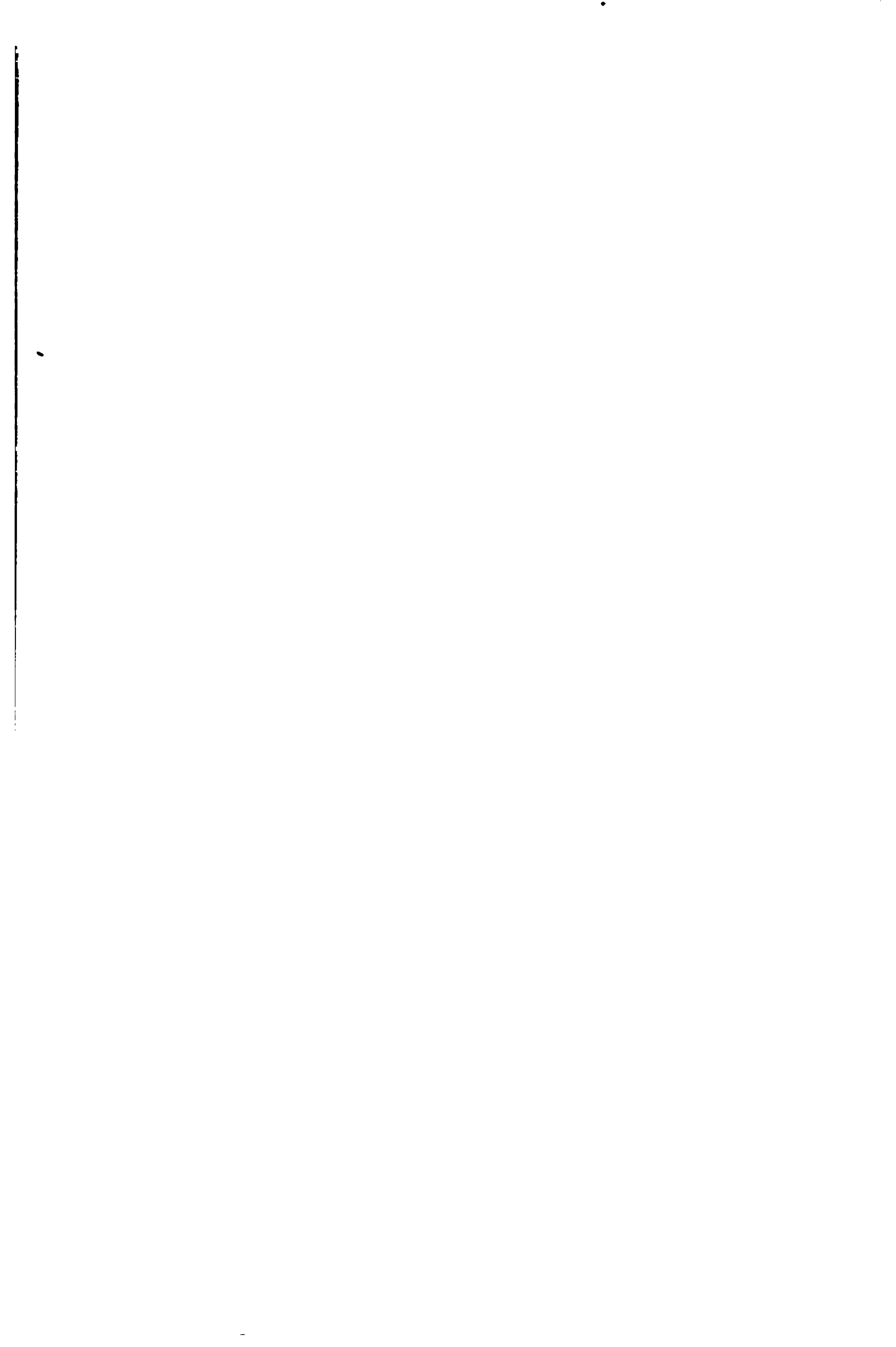



UC-NRLF
B 3 789 141











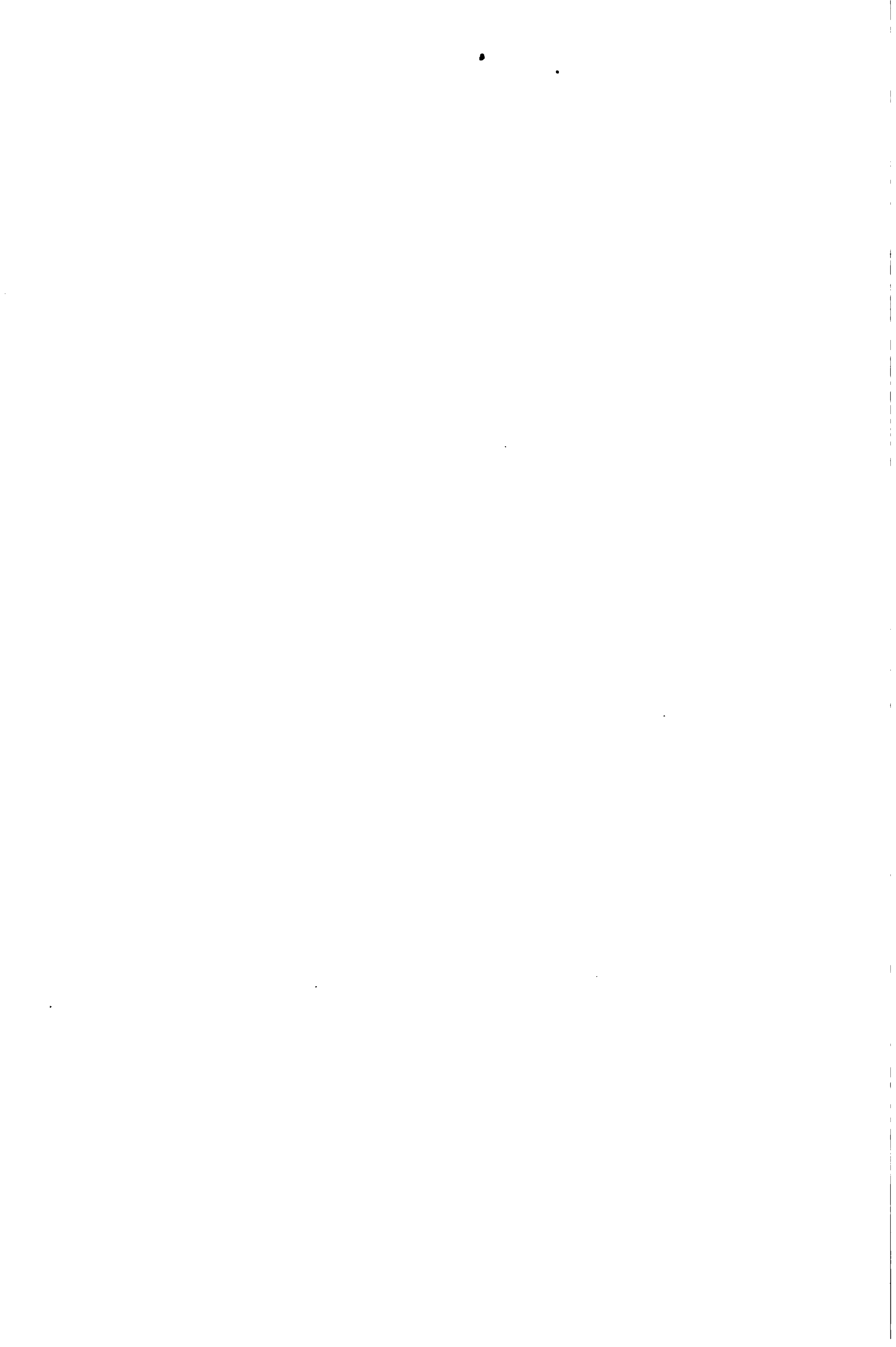
CENTRALBLATT

für

Bakteriologie, Parasitenkunde und Infektionskrankheiten.

Erste Abteilung. XXXII. Band.

Originale.



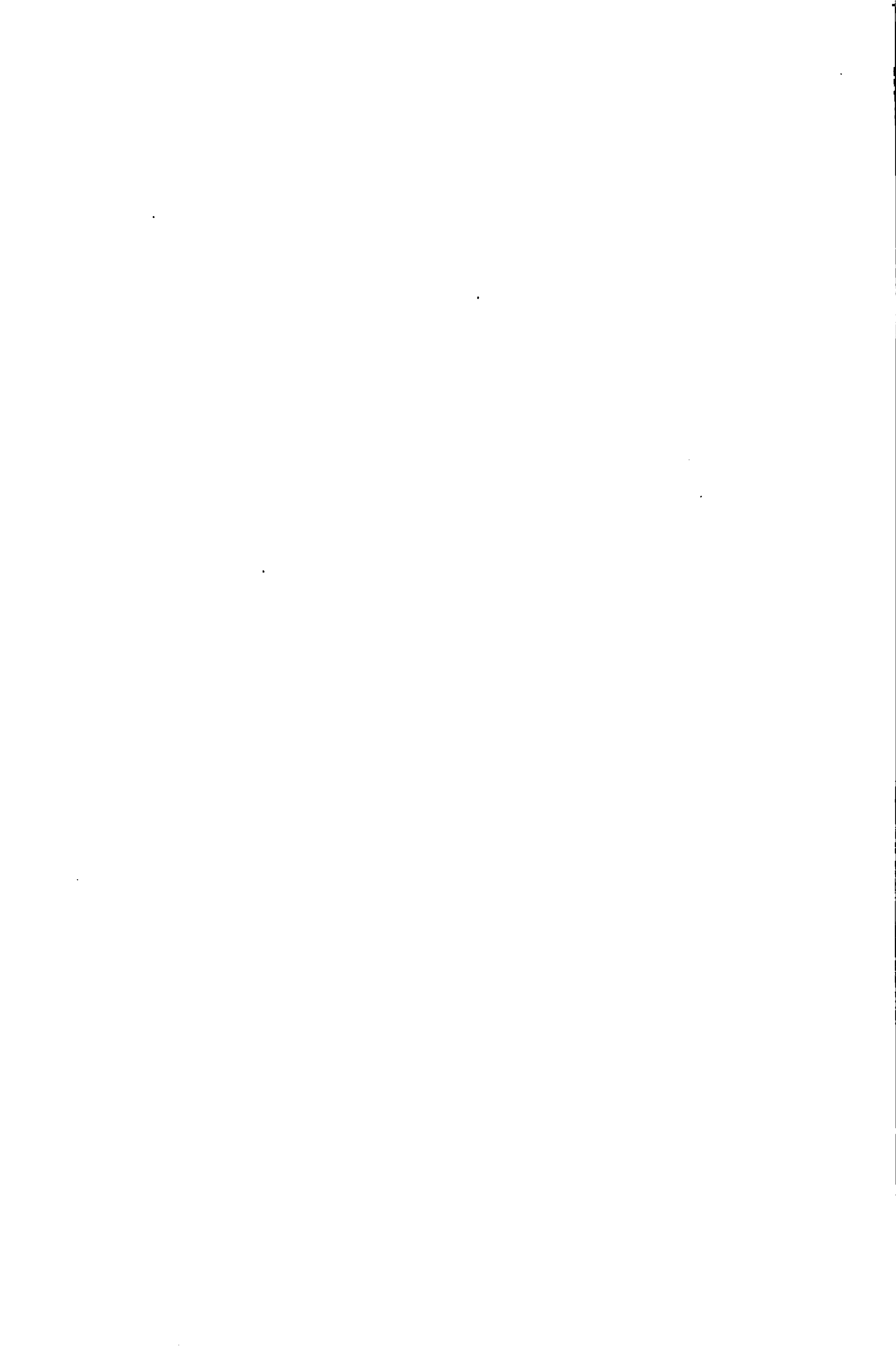
CENTRALBLATT

für

Bakteriologie, Parasitenkunde und Infektionskrankheiten.

Erste Abteilung. XXXII. Band.

Originale.



CENTRALBLATT

für

Bakteriologie, Parasitenkunde

und Infektionskrankheiten.

In Verbindung mit

Geh. Med.-Rat Professor Dr. Loeffler
in Greifswald,

Professor Dr. R. Pfeiffer
in Königsberg

und

Staatsrat Professor Dr. M. Braun
in Königsberg

herausgegeben von

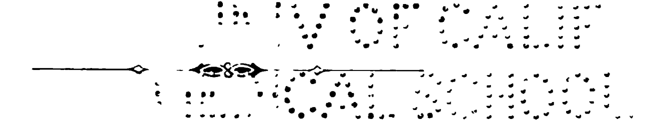
Dr. Oscar Uhlworm in Berlin.

Erste Abteilung. XXXII. Band.

Medizinisch-hygienische Bakteriologie und tierische Parasitenkunde.

Originale.

Mit 21 Tafeln und 94 Abbildungen im Texte.



Jena,

Verlag von Gustav Fischer.

1902.

Centralblatt

für

Bakteriologie, Parasitenkunde und Infektionskrankheiten

Erste Abteilung:

Mediz.-hygien. Bakteriologie u. tier. Parasitenkunde

Originale

In Verbindung mit

Geh. Med.-Rat Prof. Dr. Loeffler, Prof. Dr. R. Pfeiffer, Prof. Dr. M. Braun
Greifswald — Königsberg i. Pr.

herausgegeben von

Dr. O. Uhlworm in Berlin W., Schaperstr. 2/3 I

Verlag von Gustav Fischer in Jena

XXXII. Band. — Jena, den 5. Juli 1902. — **No. 1.**

Preis für den Band (50 Bogen) 15 Mark. Schwierige Tafeln werden einem Bogen gleich gerechnet. — Die Nummern erscheinen zwanglos je nach dem vorliegenden Stoffe. Bei Einzelverkauf Preis für einen einfachen Druckbogen 40 Pfg., für eine Tafel 60 Pfg.

Hierzu als regelmäßige Beilage die Inhaltsübersichten der II. Abteilung des Centralblattes.

Die Redaktion des „Centralblatts für Bakteriologie und Parasitenkunde“ richtet an die Herren Mitarbeiter die ergebene Bitte, etwaige Wünsche um Lieferung von besonderen Abdrücken ihrer Aufsätze entweder bei der Einsendung der Abhandlungen an die Redaktion auf das Manuskript schreiben zu wollen oder spätestens nach Empfang der ersten Korrekturabzüge direkt an den Verleger, Herrn Gustav Fischer in Jena, gelangen zu lassen.

Original-Mitteilungen. *Nachdruck verboten.*

Die wichtigsten Methoden der Bakterienfärbung in ihrer Wirkung auf die Membran, den Protoplasten und die Einschlüsse der Bakterienzelle.

[Arbeit aus dem Botanischen Institute der Universität Marburg.]

Von **Arnold Grimme,**
Kreistierarzt in Melsungen (Hessen-Nassau).

Mit 2 Tafeln.

Nachdem in den letzten Jahren von Herrn Prof. Arthur Meyer-Marburg (1897 u. 1899) eine Reihe von Inhaltsbestandteilen der lebenden Bakterienzelle, z. B. Zellkerne, Vakuolen, Phasen der Sporenentwickelung, besonders aber die Reservestoffe Fett und Glykogen genauer erforscht und gedeutet war, erschien es von Interesse, das Verhalten dieser Ein-

schlüsse auch in nach der alten Koch'schen Vorschrift hergestellten Deckglastrockenpräparaten zu studieren. Die zahlreichen verschiedenartigsten, oft wunderbaren Befunde der Bakteriologen über den Bau der Bakterienzelle ließen vermuten, daß manche Beobachtung über morphologische Eigentümlichkeiten der Bakterienzelle eine falsche Deutung erfahren habe oder gar auf Kunstprodukte, durch unzweckmäßige Anwendung der so überaus zahlreichen Bakterienfärbemethoden hervorgerufen, zurückzuführen sei. Um diese Fragen aufzuklären, veranlaßte mich Herr Prof. Arthur Meyer die in folgender Disposition ausgedrückten Fragen unter seiner Leitung im botanischen Institute der Universität Marburg zu bearbeiten:

I. Untersuchung von Bacillus tumescens Zopf, B. cohaerens A. M. et Gottheil und Bacterium phlei (Thimotheebacillus A. Möller) in den verschiedenen Entwickelungs- und Altersstadien. Diese Bakterien sind zu prüfen auf

a) ihr Verhalten gegen die verschiedenen Reagentien
   α) als lebende Bakterien in Wasser, Jodjodkalium, Formolfuchsin, Methylenblau.
   β) als fixierte Bakterien behandelt mit Fuchsin, Methylenblau, Färbung nach Gram, Carbolfuchsin + Säure (in Wasser und Canadabalsam untersucht).
b) Welche protoplasmatischen und alloplasmatischen Organe und welche ergastischen Gebilde treten bei den verschiedenen Färbemethoden hervor und wie ist deren Verhalten gegen die verschiedenen Reagentien?

II. Die verschiedenen Färbemethoden für fixierte Bakterien, ihre Prinzipien und ihre Wirkung.

1) Fuchsinfärbung (Säurefestigkeit). Zur Lösung dieser Frage wurde der Thimotheebacillus und der Bacillus der Geflügeltuberkulose untersucht.
2) Methylenblaufärbung. Im Laufe der Arbeit wurden für diese Frage Spirillum volutans, Bacillus alvei, Pseudomonas spec., B. asterosporus und der Diphtheriebacillus benutzt.
3) Gram'sche Methode.

B. tumescens Zopf war wegen seines reichen Gehaltes an Fetttropfen, B. cohaerens A. M. et Gottheil wegen seines Glykogengehaltes geeignet, zur Entscheidung des Verhaltens dieser Reservestoffe in Deckglastrockenpräparaten gegen verschiedene Farbstoffe. Bei beiden konnte ferner das Verhalten der jungen Sporenanlagen und der Membran, bei B. tumescens und B. asterosporus das Auftreten des Zellkernes, bei B. cohaerens die Degenerationsformen, welche dieser Bacillus früh und in großer Menge bildet, Berücksichtigung finden. Der Thimotheebacillus (Grasbacillus I A. Möller, B. phlei) wurde gewählt, weil er zum Studium der Eigentümlichkeit der Säurefestigkeit geeignet war.

Besonderes Gewicht wurde auf die gleichartige Untersuchung der charakteristischen Entwickelungsstadien der Spaltpilze gelegt. Bei den nicht sporenbildenden Arten, Pseudomonas erythrospora (es gelang mir nicht, Sporen zu erhalten), Spirillum volutans und Thimotheebacillus kann man natürlich von Entwickelungsstadien im engeren Sinne nicht reden, sondern muß sich mit der Untersuchung der verschiedenen Alterszustände der Kolonie begnügen. Von den sporogenen Arten, B. tumescens und B. cohaerens, untersuchte ich alle Ent-

wickelungsstadien. Ich verweise dazu auf die Arbeiten von A. Meyer (1897 u. 1899) und Gottheil (1901).

Zuerst arbeitete ich mit lebendem Material nach Methoden und mit Reagentien, die A. Meyer in seinen Arbeiten anwendete, um mich selbst über die Reaktion und Natur der verschiedenen Bestandteile der lebenden Zelle genau zu unterrichten. Die Herstellung und Färbung der Trockenpräparate geschah im allgemeinen nach der alten Koch'schen Vorschrift; es wurden auch die Anweisungen, welche Abel (Taschenbuch für den bakteriologischen Praktikanten, Würzburg 1900) und Günther (Einführung in das Studium der Bakteriologie, Leipzig 1898) geben, benutzt. In einzelnen Fällen versuchte ich neue Methoden nach den Angaben der jüngsten Litteratur und werde das eventuell jedesmal hervorheben.

Bezüglich der Arbeiten mit lebendem, nicht angetrockneten Material verweise ich nochmals auf die oben angezogenen Arbeiten von A. Meyer, in welchen sich die Methoden etc. verzeichnet finden. Bei der Behandlung der Trockenpräparate verfuhr ich folgendermaßen: Von der Mitte einer bestimmte Stunden alten Agarkultur wurde eine Platinöse voll Bakterienmasse abgenommen, in etwas Wasser verrieben und hiervon auf eine Anzahl sauber und fettfrei hergerichteter Deckgläser mit der Platinnadel aufgestrichen. Nach dem Trockenwerden an der Luft wurden die Präparate dreimal mäßig langsam durch die Bunsenflamme gezogen und zur schnellen Wiedererkennung der Materialseite mit einem Fettstift an einer Ecke bezeichnet. Bei kontinuierlicher Verfolgung mehrerer Reaktionen an ein und demselben Objekt konnte die Fixierung meist nicht entbehrt werden; sie unterblieb jedoch in einzelnen Fällen, bei denen ich dies besonders erwähnen werde. Ich spreche dann von angetrockneten Präparaten. Ich ließ also dann den Bakterien haltenden Tropfen auf dem Deckglase an der Luft trocknen und verwendete das Präparat sofort.

Die Zusammensetzung der zur Verwendung kommenden Färbemittel und Reagentien war die folgende: Wässerige Fuchsin- oder Methylenblaulösung (bezeichnet mit 1 + 10) = 1 ccm gesättigter alkoholischer (95-proz.) Lösung des Farbstoffes und 10 ccm Wasser (A. Meyer 1897, S. 192); die Fuchsinlösung 1 + 10 ist nicht haltbar und muß zum jedesmaligen Gebrauch frisch bereitet werden, die Methylenblaulösung dagegen hält sich unbegrenzt, wenn man von der Verunreinigung durch Methylenazur, einem roten Farbstoff, der aus dem Methylenblau durch Aufnahme von Alkali aus dem Glase gebildet wird, absieht [Michaelis 1901, S. 765]. Die Gegenwart des Azur stört nicht, kann bei einigen Färbemethoden sogar erwünscht sein. Carbolfuchsin = 10 cm der gesättigt alkoholischen Fuchsinlösung und 100 ccm 5-proz. Carbolsäurelösung (Ziehl 1882, S. 451). Löffler's Methylenblaulösung = 30 ccm gesättigter alkoholischer Methylenblaulösung und 100 ccm einer Kalilaugelösung von 1 : 10000 (Löffler 1884, S. 439). Anilinwassergentianaviolett: 4 ccm Anilinöl werden mit 100 ccm Wasser geschüttelt und diese Emulsion bezw. Lösung durch ein angefeuchtetes Filter filtriert. Zum Filtrat setzt man 11 ccm einer gesättigten alkoholischen (95-proz.) Gentianaviolettlösung (Ehrlich 1882, S. 270). Diese Farbstofflösung ist erst nach 12—24 Stunden brauchbar und hält sich meist nur einige Wochen; Fuchsinlösung *v* = 2 ccm einer gesättigten alkoholischen Fuchsinlösung, 10 ccm Alkohol (95-proz.) und 10 ccm Wasser (A. Meyer 1899, S. 451); Gelblösung = 0,2 g Dimethylamidoazobenzol und 50 ccm 95-proz. Alkohol (A. Meyer 1899); Sudanlösung = Sudan III (Grübler & Co.

Leipzig) 0,1 g in 20 ccm 95-proz. Alkohol (A. Meyer 1899, S. 434); Delafield's Hämatoxylin: Man löst 4 g kryst. Hämatoxylin in 25 ccm absolutem Alkohol und zugleich 52 g kryst. Ammoniakalaun in 400 ccm Wasser und mischt darauf beide Lösungen. Man filtriert nach 3—4 Tagen und setzt hinzu 100 g Glycerin und 100 g Methylalkohol. Nach einigen Stunden wird wieder filtriert. — Jodjodkalium *k* = 3 g Jod, 3 g Jodkalium, 20 ccm Wasser und Jodjodkalium *sch* = 2 g Jod, 1 g Jodkalium, 200 ccm Wasser (A. Meyer 1899, S. 442); Jodjodkalium zur Gramschen Färbung = 1 g Jod, 2 g Jodkalium, 300 g Wasser (Gram 1884); Chlorzinkjodlösung = 30 g Chlorzink. 5 g Jodkalium, 0,8 g Jod, 14 ccm Wasser; Salzsäurealkohol = 3 ccm Salzsäure, 100 ccm 95-proz. Alkohol; Chloralhydratlösung = 5 g Chloralhydrat, 2 g Wasser; Eau de Javelle (zu botanischen Zwecken, siehe A. Meyer 1901, S. 15).

Die Kulturen wurden auf Agar folgender Zusammensetzung ausgeführt: Pepton Witte 6 g, Fleischextract Liebig 4 g, Chlornatrium 1 g, Dextrose 5 g, Agar 8 g, Wasser 500 g. Die Art der Zubereitung war dieselbe, wie sie von Gottheil angegeben wurde (1901, S. 432). Zur Züchtung des Thimotheebacillus wurde derselbe Agar mit Glycerinzusatz (6 Proz.) verwendet (Glycerinagar). Die Kulturen wurden, wenn nichts anderes bemerkt ist, bei 28° gehalten. Alles zur Impfung benutzte Sporenmaterial war mindestens einige Wochen alt und vorher 1—2 Minuten auf 100° erhitzt.

Die Zeichnungen sind mittels des Zeichenapparates ausgeführt und zwar mit Objektiv Immers. $^1/_{12}$, Ap. 1,25 und Okular 12 (Compensations-) von Zeiss. Die Vergrößerung der Figuren beträgt 2350.

B. tumescens Zopf.

I. Untersuchung des lebenden Materials.

Ich gebe zuerst eine Beschreibung des zu allen Versuchen benutzten Materials, welches in lebendfrischem Zustande in Wasser liegend untersucht wurde.

Sporen. Sie wechseln in ihrer Größe und Form. Sie sind meist ellipsoidisch und an beiden Polen mit je einem Spitzchen versehen. Sie lassen schon im ungefärbten Zustande eine dicke Membran erkennen, die sich in eine dickere Intine und dünnere Exine gliedert (s. auch A. Meyer 1899 und Gottheil 1901) (Fig. I *a*). In Jodjodkalium *sch* färben sich die Sporen gelb. Besonders an den gequollenen Sporen ist mit diesem Reagens (mehr noch in konzentrierter Lösung) die Gliederung der gelbgefärbten Membran in Intine und Exine sehr deutlich zu sehen. In Formolfuchsin nehmen die reifen Sporen keine Farbe an, allenfalls zeigt die Exine der gequollenen einen schwach rötlichen Schimmer.

Keimstäbe. Dieselben wurden einer Agarkultur entnommen, die 6—7 Stunden vorher mit wie immer in angegebener Weise „erhitzten" Sporen geimpft war. Das Protoplasma der Keimstäbe ist völlig homogen, allenfalls kann man eine äußerst feine Granulierung beobachten (Fig. II *a*). In Jodjodkalium färben sich die Keimstäbe gleichmäßig gelb. Formolfuchsin färbt sie hellrot mit einem leicht bläulichen Schimmer. In einzelnen Stäbchen sind ein oder mehrere dunkler rot gefärbte Punkte deutlich zu sehen (Kerne, A. Meyer 1899, S. 454). Die Membran ist rot gefärbt. Die Formolfuchsinfärbung wurde in der Weise ausgeführt, wie es A. Meyer 1899, S. 451 vorschreibt, ebenso die Methylenblau-

Sudan-Methode (A. Meyer 1899, S. 434). Nach letzterem Färbeverfahren werden die Keimstäbe gleichmäßig blau. Ihre Membran wird jedoch schwach oder nicht gefärbt. Die jungen Septen bleiben völlig ungefärbt.

Ruhestäbe (20—25 Stunden alt). Ungefärbt sieht man in ihnen zahlreichere größere und kleinere scharf begrenzte und stark lichtbrechende Kugeln, die sich nach Zusatz von Sudanlösung hellrot, nach Zusatz von Gelblösung gelb färben (Fig. III *a*) (Fett; A. Meyer 1899, S. 434). In Jodjodkalium *sch* färbt sich das Cytoplasma der fettführenden Ruhestäbe gelb, die Fetttropfen selbst dunkelgelb, ebenso die Membran. Jodjodkalium *k* färbt den Protoplasten mit allen seinen Einschlüssen sowie die Membran gleichmäßig gelb- bis dunkelbraun. In Formolfuchsin nehmen die Ruhestäbe eine mattrote Färbung an, auch die Membran ist mitgefärbt. Die Fetttropfen färben sich nicht. Mit der Methylenblau-Sudan-Methode behandelt treten die Fetttropfen der Ruhestäbe als hellrote, scharf umrandete Kugeln in dem blau gefärbten Cytoplasma hervor.

Sporangien (28 Stunden alt). In den dicken, eiförmigen Zellen finden sich häufig Sporenanlagen an den Polen der Zellen (Fig. IV *a*). Seltener sind fast ausgebildete Sporen mit Membran, noch seltener völlig ausgebildete fettfreie Sporangien mit fertiger Spore.

Jodjodkaliumlösung *sch* hebt vor allem die Fetttropfen, welche sich dunkelgelb färben, scharf hervor. Das Cytoplasma und der fertile Teil der Zelle mit Sporenvakuole ist schwach gefärbt. Aeltere Sporenanlagen färben sich dagegen kräftig gelb.

Formolfuchsin färbt die jungen Sporangien in der Weise, daß in günstig gefärbten, vor allen Dingen nicht überfärbten Präparaten häufig kleine dunkelrote Punkte, die unregelmäßig im Plasma verteilt sind, aber nicht selten auch eine charakteristische Lage im Centrum der helleren „Sporenvakuole" (s. A. Meyer 1897, S. 195) zeigen, auftreten (Kerne) (Fig. IV *b*). In etwas älteren Sporangien färbt sich mit Formolfuchsin die polar gelegene „Sporenanlage" kaum und hebt sich nur schwach von dem durch die ungefärbten Fetttropfen fleckig erscheinenden, hellroten Protoplasten ab. Bei stärkerem Fuchsinzusatz färbt sie sich jedoch; die Fetttropfen werden durch die stärkere Rotfärbung des Cytoplasma sehr verdeckt, die Membran färbt sich kräftig. Methylenblau-Sudan färbt das Cytoplasma hellblau; die „Sporenanlagen" werden als dunkelblau gefärbte, zuerst etwas kleinere rundliche, später größere ovoide Gebilde sehr scharf sichtbar. Die Fetttropfen färben sich rot (Fig. IV *c*, *c'* u. *c''*). Andere durch Methylenblau differenzierte Gebilde sind im Innern der Zellen nicht zu bemerken. Die reifen Sporen mit Membran erscheinen gelbrötlich von einem hellblauen Rand umgeben; der an einem Pol zusammengedrängte Plasmarest ist dunkelblau (Fig. IV *c'''*).

II. Untersuchung des fixierten Materials.

Die Färbung der Präparate mit erwärmter Farblösung wurde immer in der Weise vorgenommen, daß ich das in der Cornetpinzette gehaltene und mit Farblösung beträufelte Präparat 10—60 Sekunden lang langsam durch die Spitze der Bunsenflamme hin und her bewegte. Es bildeten sich dabei leichte Dämpfe, keine Blasen.

A. Fuchsinfärbung.

Sporen. Bei der Untersuchung der Keimstäbe findet man naturgemäß viele angeschwollene und nicht angeschwollene Sporen, deren Verhalten gegen die Färbungen jedesmal zuerst besprochen werden soll. Die Sporen färben sich ungleichartig; die nicht angeschwollenen bleiben bei 5 Minuten langer Färbung in kalter Fuchsinlösung 1 + 10 ungefärbt oder zeigen höchstens die dünne Exine mit den Spitzchen rot (Fig. I *b*). Bei den angeschwollenen ist das Sporenstäbchen und die Exine kräftig dunkelrot gefärbt, die dicke Intine blaßrot (Fig. I *c*). In den unter Erwärmen gefärbten Präparaten wird mit zunehmender Dauer der Erhitzung die Färbung der einzelnen Sporenteile immer intensiver. Auch bei den sich schlecht färbenden Sporen tritt dann eine gleichmäßige schwache Färbung der Intine und des Sporenstäbchens ein, die nach einer 1 Minute langen Erhitzung ebenso stark ist als die Färbung der Intine der sich leicht färbenden Sporen (Fig. I *d*). Die Färbung der Exine und des Sporenstäbchens der letzteren ist bei der längeren warmen Färbung eine fast schwarzrote geworden.

Keimstäbe. Die 5 Minuten lange Färbung der Präparate in kalter Fuchsinlösung 1 + 10 zeigt den Inhalt der Keimstäbe gleichmäßig rot, auch die Membran ist ebenso gefärbt; Differenzierungen irgend welcher Art sind weder bei dieser noch bei den folgenden Färbungen der Keimstäbe im Cytoplasma derselben wahrzunehmen. Hier und da bemerkt man in geringer Entfernung von dem Rande des gefärbten Bildes eine feine blaßrote Linie, die meist in gleichbleibendem Abstande die Zellgrenze begleitet, seltener sich bauchig von derselben abhebt (Schleimschicht) (Fig. II *b*). Nach 10 Sekunden langer Färbung unter Erwärmen färben sich die Keimstäbe kräftiger, schrumpfen jedoch erheblich und bekommen dadurch unregelmäßige Konturen. Nach 30—60 Sekunden langer Erwärmung ist die Färbung eine noch dunklere geworden. An den Enden der Stäbe sieht man häufig die nunmehr hellrot gefärbte Membran abgehoben, jedoch mit der des anstoßenden Stäbchens zusammenhängend, während der Protoplast sich erheblich verkürzt hat (Fig. II *c*).

Ruhestäbe. Nach 5 Minuten langer Einwirkung der kalten Fuchsinlösung 1 + 10 ist das Cytoplasma lebhaft hellrot gefärbt; in ihm liegen zahlreiche ungefärbte, nicht scharf begrenzte, mehr oder weniger rundliche Flecke (Fetttropfen). Die Membran ist schwach gefärbt. In einzelnen Zellen finden sich 1 oder 2 bei hoher Einstellung dunkelrote, bei tiefer ungefärbte oder gelbliche runde Körnchen (Vakuolen, s. Arthur Meyer 1897, 1901) (Fig. III *b*). Bei der 10 oder 30 Sekunden langen Einwirkung der erwärmten Fuchsinlösung erscheinen die Fetttropfen ebenfalls als größere oder kleinere blaßrote Flecke, deren Ränder sehr undeutlich und verschwommen sind. Die Membran ist hellrot gefärbt (Fig. III *c*). Nach der 1 Minute langen Einwirkung der warmen Farblösung ist das Cytoplasma dunkelrot gefärbt und hat sich stellenweise von der jetzt kräftiger rot gefärbten Membran zurückgezogen. Das Cytoplasma tritt punkt- oder fleckenförmig auf, während der übrige Zellinhalt sehr unregelmäßig begrenzte hellrote Flecken bildet (Fett) (Fig. III *d'*, *d''*). Ebenso wie an Keimstäben findet man auch an vielen Zellen der übrigen Entwickelungsstadien feine, rote, die Zellgrenze in gewissem Abstande begleitende Linien (Schleimschicht) (Fig. III *c*).

Sporangien. Die Sporenanlagen färben sich (sowohl 5 Minuten

kalt als auch 10—60 Sekunden erwärmt) kräftig und treten bei den schwachen Färbungen in einen scharfen Gegensatz zu dem noch ziemlich hell gefärbten Cytoplasma (Fig. IV *e'* und *f*). Bei der 60 Sekunden langen Färbung in erwärmter Farblösung, in welcher auch das Cytoplasma dunkelrot gefärbt wird, ist der Kontrast nicht so auffallend (Fig. IV *g*). Die bereits mit einer Membran umgebenen Sporen färben sich nicht in der kalten und der nur kurze Zeit erwärmten Farblösung, erst bei der 60 Sekunden langen Erhitzung nehmen sie eine rote Farbe an. Die Fetttropfen verhalten sich ebenso wie in den Ruhestäben bei gleicher Behandlung; sie sind mitgefärbt und nicht mehr zu erkennen als solche nach 50—60 Sekunden langer Färbung in erwärmter Farblösung. Vielfach sind die kleineren Fettkugeln zu größeren zusammengeflossen (wahrscheinlich durch die Einwirkung der Wärme beim durch die Flamme ziehen) und täuschen in dieser Gestalt jüngere Sporen vor. In den Sporangien mit fertigen Sporen, in welchen keine Spur von Fett mehr vorhanden ist, finden sich an einem oder beiden Polen Plasmareste, die den Farbstoff intensiv annehmen (Fig. IV *e''*). Die Sporen dieser Sporangien haben, wenn sie 5 Minuten lang mit kalter Fuchsinlösung in Berührung waren, einen hellrot gefärbten Hof. Andere Sporangien zeigen keine Inhaltsmassen und bestehen nur aus der schwach gefärbten Membran, von welcher die fertige ungefärbte Spore noch umschlossen ist.

Karbolfuchsin färbt die verschiedenen Entwickelungsstadien in derselben Weise wie gewöhnliches Fuchsin. Im allgemeinen ist jedoch die Färbung eine intensivere und wird schon nach verhältnismäßig kurzer Einwirkung des Farbstoffes eine tiefe Rotfärbung der Präparate erzielt. Bei Prüfung der Einwirkung von Entfärbungsflüssigkeiten auf die mit heißem Karbolfuchsin gefärbten Präparate ergiebt sich das überraschende Resultat, daß gewisse Entwickelungsstadien oder gewisse Bestandteile der Zelle den roten Farbstoff länger festhalten als andere. Es wurden bei diesen Versuchen die Präparate wie folgt behandelt: In einem mit Karbolfuchsin gefüllten Porzellanschälchen wurden sie allmählich über schwacher Flamme bis zum Aufkochen erhitzt und dann noch 1—2 Minuten mit dieser heißen Farblösung in Berührung gelassen. Darauf wurden sie 10 Sekunden lang in 5-proz. Schwefelsäure getaucht, dann mindestens $^1/_2$ Minute lang in 70-proz. Alkohol und schließlich mit Wasser abgespült. Die Untersuchung erfolgte in Wasser.

Sporen. Die Sporen färben sich sämtlich kräftig in der kochenden Karbolfuchsinlösung. Nach der Entfärbung behalten die meisten Sporen eine kräftig rote Farbe, nur die Intine entfärbt sich (Fig. I *e*); bei anderen sind Stäbchen und Exine nur rosarot geblieben, die Intine ist auch ungefärbt, aber dicker (gequollene Sporen) (Fig. I *f*).

Keimstäbe. Die 6 Stunden alten Keimstäbe haben noch eine kräftig rote Farbe (Fig. II *e*). Läßt man jedoch an Stelle der 5-proz. Schwefelsäure 3-proz. Salzsäurealkohol 1 Minute lang einwirken (Günther 1898, S. 259) und spült dann sofort in Wasser ab, so bleibt nur noch ein hellrosa Schimmer der Stäbe erhalten. Eine starke Rotfärbung der Keimstäbe bleibt nach Einwirkung der 5-proz. Schwefelsäure bestehen, wenn man die Präparate 5 Minuten lang mit heißem Karbolfuchsin unter mehrmaligem Aufkochen behandelt (Fig. II *f*). In beiden Fällen sieht man im Innern der Keimstäbe runde, in den schwächer gefärbten Präparaten scharf begrenzte, ungefärbte Lücken, die bei hoher Einstellung dunkel mit hellerem Rande, bei tiefer hell erscheinen (Vakuolen). Fast immer sieht man die Stäbe mit hellroten Linien in bestimmtem

geringem Abstande umsäumt, wie ich sie schon oben beschrieben habe (Schleimschicht).

Ruhestäbe. Das Cytoplasma der Ruhestäbe entfärbt sich nach der Einwirkung der Schwefelsäure, nicht selten bleibt jedoch ein rosafarbener Schimmer erhalten. In allen Stäben finden sich meist unregelmäßig begrenzte, ungefärbte Flecke (Fett).

Sporangien. In jungen, etwa 25—30 Stunden alten Sporangien färben sich die jungen Sporen und deren Anlagen dunkel- bis schwarzrot sowohl bei der Behandlung mit kaltem (5 Minuten) als auch mit erwärmtem (1 Minute) Karbolfuchsin. Die in der oben beschriebenen Weise ausgeführte Entfärbung bewirkt, daß Cytoplasma nebst Membran völlig farblos werden, während die Sporenanlagen und jungen Sporen eine kräftig rote Farbe behalten (Fig. IV *h'* u. *h''*). Bei den Sporangien sowohl wie bei den Ruhestäben ist die feine, die Zellgrenzen begleitende Linie häufig zu sehen (Schleimschicht).

B. Methylenblaufärbung.

Sporen. Die ausgewachsenen Sporen (geschwollene und nicht geschwollene) verhalten sich ebenso wie in der Fuchsinfärbung.

Keimstäbe. Bei der Färbung der Keimstäbe mit Methylenblau 1 + 10 fällt auf, daß die Schrumpfung der Zellen wie sie bei der Färbung in erwärmter Fuchsinlösung beobachtet wurde, hier nicht oder sehr schwach eintritt. Im übrigen zeigen sich keine Abweichungen.

Ruhestäbe. Das Cytoplasma der Ruhestäbe färbt sich bei der Behandlung mit kalter Methylenblaulösung 1 + 10 (5 Minuten) kräftig. In dem blauen Cytoplasma liegen viele größere und kleinere, ungefärbte, scharf begrenzte Kugeln (Fett). Auch nach der Einwirkung der erhitzten Farblösung (10—60 Sekunden) erleiden die Fetttropfen geringere Veränderungen als nach der Fuchsinfärbung; sie werden jedoch auch hier um so verschwommener und unregelmäßiger, je länger die erwärmte Methylenblaulösung einwirkt.

Sporangien. Auch bei der Färbung der jüngeren Sporangien mit Methylenblau ist nichts besonderes zu bemerken, was nicht schon bei der Fuchsinfärbung oder bei der Färbung lebenden Materials beobachtet wäre. Die Fetttropfen, welche nicht selten zu größeren zusammengeflossen sind, sind auch hier besser erhalten geblieben als bei der Fuchsinfärbung und zeigen selbst bei 60 Sekunden langer Färbung in erhitzter Lösung mit wenigen Ausnahmen noch eine deutliche Kugelform. Die jungen Sporenanlagen sind dunkelblau gefärbt (Fig. IV *d'* u. *d'''*).

In keinem der Methylenblaupräparate waren andere als die beschriebenen Differenzierungen, insbesondere keine intensiver gefärbten Pünktchen oder Kugeln, abgesehen von den Sporenanlagen, zu finden. Die Schleimschicht der Membran war in manchen Fällen zu erkennen; im allgemeinen jedoch bedeutend seltener als bei der Fuchsinfärbung.

C. Die Gram'sche Methode.

Dieselbe wurde bei den nachfolgenden Versuchen ebenso wie bei allen späteren in der Weise ausgeführt, daß das fixierte Präparat mit der Anilinwassergentianaviolettlösung beschickt über der Bunsenflamme 2 Minuten lang so weit erwärmt wurde, daß eine schwache Entwickelung von Dämpfen eintrat. Die Farblösung wurde dann schnell abgegossen und das Präparat in eine frische Jodjodkaliumlösung (Jod 1, Jodkalium 2, Wasser 300) ebenfalls 2 Minuten lang versenkt. Ich hing dabei die

Präparate mittels einer Cornetpinzette an einem kleinen Stativ auf, so daß sie in die Lösung tauchten. Schließlich wurden die Präparate 1 Minute lang auf dieselbe Weise in frischen absoluten Alkohol gebracht, wobei häufig umgeschwenkt wurde. Nach dem Abspülen unter der Wasserleitung wurden die Präparate in Wasser untersucht. Im Laufe der Untersuchungen angewendete Modifikationen des Gram'schen Verfahrens sind jedesmal besonders hervorgehoben worden.

Sporen. Dieselben zeichnen sich durch eine äußerst scharfe Färbung aus. Die Intine ist auch hier ungefärbt, während Sporenstäbchen und Exine schwarzblau gefärbt sind. Die Schärfe der Grenzen der einzelnen Sporenteile ist eine vorzügliche. Die Spitzen der Exine treten deutlicher wie bei jeder anderen Färbemethode hervor (Fig. I *g*).

Keimstäbe. Die 6 Stunden alten Keimstäbe zeigen nach der Gram'schen Methode behandelt eine tief blauschwarze Farbe ohne irgend welche Abstufungen. Die Begrenzung der Zellen ist eine gerade und scharfe (Fig. II *g*). Die einzelnen Keimstäben noch anhaftende Sporenmembran zeigt ebenfalls die blauschwarze Farbe der Exine.

Ruhestäbe und Sporangien. Dieselben zeigen ebenfalls eine tief blauschwarze Farbe, jedoch tritt bei der Mehrzahl derselben eine undeutlich fleckige, hellere Zeichnung auf (Fetttropfen) (Fig. III *f* und Fig. IV *i*).

Die Entfärbung in absolutem Alkohol wurde bei weiteren Versuchen längere Zeit fortgesetzt. Nach 10 Minuten langer Einwirkung des Alkohols sind die Keimstäbe noch ebenso schwarzviolett wie nach 1 Minute. Selbst nach 60 Minuten sind die Keimstäbe noch recht dunkelviolett gefärbt, nur einzelne Bakterien oder Teile derselben sind violettrosa geworden. Dasselbe starke Festhalten der Farbe zeigen die Sporen. Die Entfärbung der Ruhestäbe ist nach 10 Minuten langer Einwirkung des Alkohols schon so weit fortgeschritten, daß die Plasmafarbe hellviolett geworden ist und die Fetttropfen als ganz blaßviolette, meist ziemlich scharf begrenzte, runde Flecke hervortreten. Die jungen Sporenanlagen der Sporangien, welch letztere sich sonst wie die Ruhestäbe verhalten, sind dagegen tief blauschwarz geblieben. Nach einem Aufenthalt von 20 Minuten Dauer in absolutem Alkohol hat das Plasma der Sporangien, ebenso auch das der Ruhestäbe, nur noch einen ganz schwachen Schimmer einer violetten Farbe; die Fettkugeln sind farblos. Aber auch jetzt noch haben die Sporenanlagen ihre ursprüngliche schwarzblaue Farbe behalten. Selbst ein 60 Minuten langes Verweilen des Präparates in absolutem Alkohol ändert an diesem Bilde nichts (Fig. IV *k* u. *l*).

III. Untersuchung der fixierten Präparate in Kanadabalsam.

Die eben dargelegten Beobachtungen beziehen sich wie stets, wenn nichts anderes bemerkt ist, auf Präparate, welche in Wasser liegend untersucht wurden; ich will nun die Veränderungen besprechen, welche auftreten, wenn man die gefärbten Präparate bei gewöhnlicher Temperatur trocknen läßt und dann in Kanadabalsam einbettet. Vor allem fällt auf, daß in Kanadabalsam eine erhebliche Verschmälerung der Spaltpilzzellen eintritt. Die Dicke der in Wasser liegenden, angetrockneten Keimstäbe verhält sich zu der der im Kanadabalsam eingebetteten etwa wie 3 : 2 (s. auch Gottheil 1901, S. 461). Die Fetttropfen der Ruhestäbe sind in den 5 Minuten bei Zimmertemperatur mit Fuchsin gefärbten Präparaten noch deutlich zu erkennen, jedoch sind sie sehr unscharf. Sie zeigen eine hell-

rote Farbe, während das Cytoplasma der Zelle dunkelrot bis bläulichrot erscheint (Fig. III *i*). Man sieht dieses Bild bei mittlerer Einstellung und offener Blende. Bei hoher Einstellung erscheinen an Stelle der hellen Flecke dunkelrote Punkte, jedoch nur bei halb geschlossener Blende, bei offener nicht. Bei tiefer Einstellung verkleinern sich die hellen Punkte der Fetttropfen, bleiben aber bis zum Unsichtbarwerden hell. Die Farbe der 50 Sekunden lang unter Erwärmen gefärbten Bacillen ist durchgehends blaurot geworden. Besonders erscheinen so die helleren Partien der Zellen, welche von unregelmäßig gestalteten dunkleren bis violettschwarzen Flecken begrenzt werden. Diese sind meist untereinander durch ebenso gefärbte Brücken und Bänder verbunden. Die Umrandung der Zellen ist unregelmäßig, geradezu höckerig geworden. In den Vorsprüngen liegen meist jene dunklen Flecken (Fig. III *k*). Die Methylenblaupräparate zeigen ebenfalls eine bedeutende Einschrumpfung. Der Protoplast ist fleckig gefärbt (Fetttropfen). Einzelne dunkelblau gefärbte und ziemlich scharf begrenzte Punkte treten hier und da auf (Protoplasmamasse). Die Fetttropfen sind nach 1 Minute langer Einwirkung von erwärmter Farblösung zu unregelmäßigen und verschwommenen hellen Flecken geworden; nur einzelne erscheinen noch rundlich und scharf begrenzt, was jedoch bei den mit erwärmtem Fuchsin gefärbten Präparaten nicht mehr der Fall war. In den Sporangien sind die Sporenanlagen unverändert. Die Fetttropfen sind jedoch auch hier und zwar besonders in den mit Fuchsin behandelten Präparaten sehr undeutlich und unregelmäßig geworden. Zwischen den von den Fetttropfen hervorgerufenen helleren Flecken sowie zwischen diesen und der Membran finden sich häufig dunkelblaue mehr oder weniger regelmäßige Punkte und Flecken, welche hin und wieder durch dünne Brücken miteinander verbunden sind (geschrumpfte Protoplasmamasse (Fig. IV *m*). Die Membran ist kräftig gefärbt.

B. cohaerens A. Meyer et Gottheil.

Diese von Gottheil (1901. p. 689) isolierte und beschriebene Art wurde in derselben Weise wie B. tumescens untersucht.

I. Untersuchung des lebenden Materials.

Sporen. Eine Gliederung in Protoplast und Membran ist mit Sicherheit nur an den angeschwollenen Sporen zu erkennen (Fig. V *a*, *b*). In Jodjodkalium *sch* färben sich die Sporen gelb und zeigen jetzt, besser in konzentrierter Lösung, eine dicke Membran. Diese erscheint bei den angeschwollenen Sporen deutlich in Exine und Intine gegliedert. In Formolfuchsin und verdünntem Methylenblau nehmen nur die angeschwollenen Sporen eine schwache Färbung der Exine und des Sporenstäbchens an. Die nicht geschwollenen färben sich nicht.

Keimstäbe. Sie besitzen im ungefärbten Zustande ein ziemlich homogenes Aussehen. In Jodjodkalium *sch* färbt sich das Plasma und die Membran gelb. Sehr oft sind nun auch kleinere Vakuolen im Cystoplasma zu beobachten. In Formolfuchsin nehmen die Stäbe eine ziemlich kräftig rote Färbung an. Membran und junge Septen färben sich ebenfalls in Formolfuchsin deutlich rot. In Methylenblau färben sich die Keimstäbe gleichmäßig blau. Weder bei dieser noch bei der Formolfuchsinfärbung waren Vakuolen zu erkennen.

Ruhestäbe. Ungefärbt lassen die etwa 30 Stunden alten Ruhestäbe keine besonderen Differenzierungen hervortreten. Charakteristisch

ist jedoch die Reaktion, die sie mit verstärkter Jodjodkaliumlösung geben. Der Protoplast färbt sich im allgemeinen gelbbraun; jedoch liegen in ihm kräftig rotbraune Massen, die, bald zu rundlichen Haufen geballt, bald bandartig die Zelle durchquerend, bald zu kleineren Flecken und Punkten gruppiert, der Zelle ein braunfleckiges Aussehen verleihen. Nicht selten sind diese Massen nur an einem oder beiden Polen, oder auch nur in der Mitte der Zelle abgelagert (Glykogen, siehe Arthur Meyer 1899, Fig. VII *a' a''*). Hier und da sieht man auch Vakuolen. In Formolfuchsin färben sich die glykogenhaltigen Ruhestäbe hellrot, jedoch scheint der Hauptanteil an der Gesamtfärbung der ziemlich kräftigen Rotfärbung der Membran zuzufallen, während der Protoplast nur eine mattrote oder gar keine Färbung zu erkennen giebt. In Methylenblaulösung *v* ist die Färbung eine schwächere, da die Membran sich mit diesem verdünnten Farbstoffe schlecht färbt. Meist ist auch eine fleckige Färbung der Zellen wahrzunehmen, die hier und da auch schon an mit Formolfuchsin gefärbten Stäben hervortritt.

Sporangien, ca. 50 Stunden alt. Im ungefärbten Zustande sind die jüngeren Entwickelungsstadien der Spore nur schwer zu erkennen; erst die ältere, dem Zellpole nicht mehr unmittelbar anliegende Spore tritt deutlich hervor. Dagegen sind in Jodjodkaliumlösung *sch* alle Stadien sehr deutlich zu verfolgen. Das Glykogen liegt in großer Menge in den kurzstäbigen Sporangien; an einem Pole liegt ein rundlicher ziemlich scharf begrenzter heller Fleck, in dessen Bereich Glykogen nicht nachzuweisen ist (Sporenvakuole, siehe Arthur Meyer 1901. p. 54). Die jungen, der Polmembran dicht anliegenden Sporenanlagen sind wie bei B. tumescens segmentartig und halbkugelig. Sie färben sich ebenfalls wie die jungen, schon nach dem Centrum der Zelle hingerückten Sporen in Jodjodkalium gelb. In Formolfuchsinlösung färben sich die jungen Sporangien sehr schwachrot, die an den Polen liegenden Sporenanlagen hellrot. Die anderen Entwickelungsstadien der Spore färben sich nicht. In Methylenblaulösung *v* sieht man an den Zellpolen die dunkler als der übrige Zellinhalt gefärbten Sporenanlagen; die älteren Sporen färben sich nicht oder sehr schwach.

Degenerationsformen (d. h. die im Absterben und in Lösung begriffenen Individuen). Zwischen scheinbar noch normalen Stäbchen einer etwa 8 Tage alten Agarkultur finden sich solche, die im Innern eine schwach lichtbrechende Körnelung oder Plasmaballen zeigen. Andere sind fast unsichtbar und nur bei genauer Beobachtung in ihren Umrissen soeben zu erkennen. In Jodjodkaliumlösung *sch* werden die plasmareichen Stäbe entweder ganz und gar kräftig gelb gefärbt und stärker lichtbrechend, während zugleich die Membran durch Gelbfärbung hervortritt, oder die Gelbfärbung und Lichtbrechung beschränkt sich auf Segmente und Körner. Bei Zusatz von Jodkalium *k* treten diese Erscheinungen noch bedeutend stärker hervor; auch in den plasmaleeren Zellen macht sich jetzt ein unregelmäßiger, fleckiger Wandbelag von Protoplasmaresten bemerkbar.

II. Untersuchung des fixierten Materials.

A. Fuchsinfärbung.

Sporen. Die nicht geschwollenen Sporen färben sich in kalter Fuchsinlösung 1 + 10 (5 Minuten) nicht; auch noch bei kurzer Erwärmung der Farblösung bleiben sie ungefärbt. Erst nach einer 1 Minute langen Färbung in heißer Fuchsinlösung färbt sich die Exine. Die übrigen

Teile der Spore bleiben auch dann noch ungefärbt oder färben sich sehr matt. Die angeschwollenen Sporen (wenigstens deren Exine und Intine) färben sich schon ziemlich kräftig in kalter Fuchsinlösung 1 + 10. Nach einer 1 Minute langen Färbung in heißer Fuchsinlösung sind Sporenstäbchen und Exine sehr kräftig rot, die Intine schwach rot gefärbt.

Keimstäbe. Dieselben färben sich in kalter Fuchsinlösung 1 + 10 (5 Minuten) gleichmäßig rot, die Membran ist nicht oder nur schwach gefärbt. Eine 15 Sekunden lange Einwirkung einer heißen Farblösung hat eine schon bedeutend stärkere Rotfärbung zur Folge. Innerhalb des Cystoplasma machen sich scharf begrenzte, bei hoher Einstellung dunkel, bei tiefer weiß erscheinende rundliche Flecke bemerkbar, die bald mehr oder weniger central, bald unmittelbar an der schwächer rot gefärbten Membran liegen (Vakuolen). Nach 50—60 Sekunden langer Färbung in der erwärmten Lösung ergiebt sich derselbe Befund. Die Membran ist auch jetzt noch hellrot gefärbt (Fig. VI *c*).

Ruhestäbe. Diese zeigen in derselben Weise, wie bisher behandelt, ein fleckiges Aussehen und auch abwechselnd heller und dunkler gefärbte Partieen. Entweder ist die eine Hälfte des Stäbchens hell und die andere dunkel, oder der mittlere Teil dunkel und beide Pole in mehr oder weniger großer Ausdehnung hell gefärbt oder auch umgekehrt. In anderen Fällen zeigen sich schwach gefärbte Bänder und Brücken von einer Wand zur anderen, während die Hauptmasse des Zellinhaltes dunkel gefärbt ist (die helleren Flecke = Glykogen, die dunkleren = Cystoplasma). Andere Stäbe zeigen dieselben oder ähnliche Bilder dunkel auf hellem Grunde. Nicht selten ist auch eine punktförmige Zeichnung vorhanden Fig. VII *b'* u. *b''*). In den mit heißer Farblösung behandelten Präparaten ist der Gegensatz zwischen den hell und dunkler gefärbten Partieen meist noch schärfer. Häufig treten ungefärbte, scharf begrenzte Lücken von band- oder punktförmiger Gestalt auf. Nicht selten sind auch hier kleinere dunkelrot gefärbte Punkte in den heller gefärbten Zellabschnitten zu beobachten (Fig. VII *c'*, *c''* u. *d*).

Sporangien. Die jungen Sporenanlagen färben sich in kalter Fuchsinlösung 1 + 10 (5 Minuten) dunkelrot. Auch dann färbt sich die junge Spore zunächst noch dunkelrot, wenn sie schon von dem Pol nach der Zellmitte hin fortgerückt ist. Bald darauf tritt diese tiefe Färbung nicht mehr ein; die jetzt schon lichtbrechende Spore bleibt ungefärbt, allenfalls färbt sich noch ein rundlicher oder länglicher centraler Fleck. Mit erwärmter Farblösung wird überall die Färbung eine kräftigere. Plasmolysen treten oft hervor. Die in kalter Farblösung sich nicht mehr färbenden jungen Sporen nehmen in der heißen Fuchsinlösung (1 Minute) eine hellrote Färbung an. Die Membran färbt sich schon in der kalten Fuchsinlösung ziemlich kräftig. Das noch in den jungen Sporangien vorhandene Plasma zeigt dagegen keine bemerkenswerten Unterschiede in der Stärke der Farbstoffaufnahme.

Degenerationsformen. Auffallend ist die Neigung des B. cohaerens, schon frühzeitig trotz guter Ernährung Degenerationsformen zu bilden, welche sich den von mir verwendeten Färbemethoden gegenüber verschieden verhalten und eigenartige Bilder liefern. Von vereinzelten Ausnahmen abgesehen, die sich als schlecht oder gar nicht gefärbte Stäbe oder Fäden schon in jüngeren Kulturen vorfinden, treten die Degenerationsformen in auffälliger Zahl erst in den sich zur Sporenbildung anschickenden Kulturen auf. Man sieht in hell gefärbten Stäbchen (die Färbung ist auf die Membran beschränkt) dunkelrote Kügelchen

(Plasmaballen), die zum Teil so scharf begrenzt erscheinen, daß sie einen normalen Bestandteil der Zelle (z. B. Kern) leicht vortäuschen (Fig. IX *a'*, *a''*). Die plasmaarmen Stäbe sind breiter, weitlumiger, welche Erscheinung wohl zum Teil durch das Zusammenfallen der Wände hervorgerufen wird. In noch nicht so weit veränderten Zellen sieht man die Anfänge der Degeneration als Lücken, Vakuolen von runder oder auch nicht selten scheibenförmiger Gestalt, welch letztere besonders an den Polen die Zelle quer durchsetzen und von der polaren Membranpartie nur durch einen kleinen Plasmarest getrennt sind (Fig. IX *c'*, *c''*). Alle diese ungefärbten Stellen sind bei hoher Einstellung dunkel, bei tiefer hell. In etwa 8 Tage alten Kulturen findet man in der Nähe des Kondenswassers besonders viele plasmaarme und plasmafreie Stäbchen, welche ungefärbt fast unsichtbar sind. Unter den noch plasmaführenden sind viele durch gegliederte Lagerung der Protoplasmareste oder durch Auftreten derselben in Körnchen- oder Kugelform ausgezeichnet. Diese Reste lassen sich durch etwas verstärkte Jodjodkaliumlösung *sch* leicht nachweisen. Manche Stäbchen erscheinen noch ganz normal und plasmareich; an einzelnen derselben sind plasmolytische Erscheinungen, die weniger auf den Degenerationszustand als auf die Jodbehandlung zurückzuführen sind, bemerkbar. Nach der Behandlung solcher Präparate mit Fuchsin 1 + 10 (5 Minuten kalt) zeigt sich sofort eine starke Färbung der Membran. An den plasmafreien Stäbchen treten fast regelmäßig deutlich abgegrenzte, immer gleich große Abschnitte, durch eine ziemlich kräftig rote Linie bezeichnet, an den Polen auf (Fig. IX *e' e''*). Nach dem Eintrocknen des Präparates sind diese „Polfelder“ auch dort deutlich, wo sie in Wasser liegend nicht auffallen. Auch Karbolfuchsin färbt diese Polfelder und die Membran der degenerierten Stäbe gut, ebenfalls aber bedeutend schwächer eine 3-proz. wässerige Safraninlösung. Zwischen den abgestorbenen liegen immer auch noch solche Stäbchen, die normal und plasmareich sind und diese Eigenschaft durch stärkeres Lichtbrechungsvermögen im ungefärbten Zustande, durch kräftige Gelbfärbung in Jodlösung und völlige Färbung in Fuchsinlösung zu erkennen geben. In älteren Kulturen (4 Wochen) finden sich neben vielen leeren Membranen (Fig. IX *l*) fast nur noch solche Stäbe, die einen mit Fuchsinlösung (es bleibt sich gleich, ob die Farblösung kalt oder heiß zur Anwendung kommt) noch gut färbbaren, in mehrere kleine Abschnitte (Segmente) zerlegten Protoplasten zeigen, der in einer hellrot gefärbten Membran liegt (Fig. IX *m*, *n*). In einer 5 Monate alten Kultur waren eigentümlicherweise ähnliche mit Fuchsin gut sich färbende Reihen von kurzen Protoplasmaballen vereinzelt sichtbar, an denen man jedoch eine deutliche Membran nicht mehr erkennen konnte (Fig. IX *o*).

Karbolfuchsin färbt die verschiedenen Entwickelungsstadien von B. cohaerens in gleich kräftiger Weise wie die von B. tumescens. Gegenüber der einfachen Fuchsinfärbung ist auch hier die Farbstoffaufnahme seitens des Plasma sowohl wie seitens der Membran eine bedeutend kräftigere. Hierdurch wird die fleckige Färbung der Ruhestäbe fast völlig verdeckt. Die mit Karbolfuchsin gefärbten Morphoden von B. cohaerens liegen schon in Wasser unmittelbar aneinander, ohne durch ungefärbte Zwischenräume getrennt zu sein. Die Einwirkung von Entfärbungsflüssigkeiten auf die in heißer Karbolfuchsinlösung gefärbten Stäbe von B. cohaerens wurde in derselben Weise wie bei B. tumescens geprüft (siehe p. 7).

Sporen. Nach der Entfärbung hat nur die Exine eine schwach-

rötliche Farbe, die zuweilen ebenfalls ganz verschwunden ist (Fig. V *e*). In den angeschwollenen Sporen hat meist das Sporenstäbchen eine hellrote, seltener dunkelrote Farbe behalten, desgleichen die Exine (Fig. V *f*).

Keimstäbe. Die 6—7 Stunden alten Keimstäbe entfärben sich in 5-proz. Schwefelsäure vollständig, seltener bleibt ein rosafarbener Schimmer zurück. Selbst wenn die mit Keimstäben bestrichenen Präparate 5 Minuten lang in Karbolfuchsin gekocht werden, tritt eine völlige Entfärbung ein (Fig. VI *b*).

Ruhestäbe. Ebenfalls entfärben sich die Ruhestäbe, nur selten bleibt eine helle Rosafarbe bestehen.

Sporangien. Es behalten nur die älteren Sporen der Sporangien eine rote Farbe. Die Sporenanlagen haben selten noch einen rötlichen Schimmer, meist sind sie völlig entfärbt; selbst eine längere Erhitzung in Karbolfuchsin ändert an diesem Verhalten nichts.

B. Methylenblaufärbung.

Sporen. In Methylenblau 1 + 10 (5 Minuten kalt) bleiben die nicht angeschwollenen Sporen ungefärbt. An den vor der Keimung stehenden, angeschwollenen Sporen färben sich dagegen Sporenstäbchen und Exine blau; letztere oft nur schwach. Dieselben Bilder treten auf bei der Erwärmung der Farblösung bis zu 60 Sekunden; im letzteren Falle ist jedoch meist auch die Exine der nicht angeschwollenen Sporen gefärbt, kräftiger die der angeschwollenen (Fig. V *c*, *d*).

Keimstäbe. In Methylenblau 1 + 10 (5 Minuten kalt) ist das Plasma gleichmäßig, seltener etwas fleckig gefärbt. Die Septen färben sich nicht, die Membran schwach. Die ungefärbten, scharf begrenzten Lücken treten auch hier scharf hervor (Vakuolen). In der erwärmten Farblösung wird die Färbung eine entsprechend dunklere, die rundlichen Lücken treten noch schärfer hervor. Abhebungen finden sich häufig, besonders an den Polen ebenso wie nach der Fuchsinfärbung. Auch schon am ungefärbten Präparat sind diese sichtbar. An den jüngsten Keimstäben, die soeben ausgekeimt sind, finden sich die erwähnten Veränderungen nicht (Fig. VI *a*).

Ruhestäbe. Die Erscheinungen an den mit Methylenblau gefärbten Ruhestäben sind völlig den bei der Fuchsinfärbung aufgetretenen entsprechend und verweise ich auf jene Beschreibung (p. 11, hierzu die Figuren VII *h*, *i'*, *i''*).

Sporangien. Auch die Färbung der Sporangien ist der vorher (p. 11) beschriebenen Fuchsinfärbung fast gleichartig. Jedoch ist, wie auch sonst allgemein beobachtet wurde, die Methylenblaufärbung eine weniger intensive; es treten deshalb die Zellbestandteile deutlicher hervor (Fig. VIII *b*—*g*). Die ziemlich häufigen Stäbchen von der Form eines Sporangium, aber noch ohne Anzeichen von Sporenbildung lassen besonders scharf hell- und dunkelblau gefärbte Abschnitte, die vorzugsweise an den Polen oder in der Mitte der Zelle ihre Lage haben, erkennen (Fig. VIII *b'* u. *b''*).

Degenerationsformen. Ebenso wie bei der Färbung mit Fuchsin verhalten sich die Degenerationsformen in der Methylenblaufärbung (Fig. IX *b*). Jedoch ist hier die Färbung der Membran nicht so kräftig wie in Fuchsin, weshalb auch die mit der Membranfärbung zusammenhängenden Bilder nicht so deutlich sind.

C. Die Gram'sche Methode.

Das Verfahren siehe p. 8.

Sporen. Die nicht angeschwollenen Sporen sind nicht gefärbt, allenfalls ist die Exine blaßblau. Die angeschwollenen sind verschiedenartig gefärbt, meist ist der Protoplast und die Exine dunkelviolett, die Intine hellviolett oder nicht gefärbt (Fig. V *g*).

Keimstäbe. Die Keimstäbe sind gleichmäßig blauschwarz gefärbt und bleiben es in Alkohol.

Ruhestäbe. Man sieht an denselben häufig größere oder kleinere, etwas heller erscheinende, unregelmäßige Flecke (Glykogen, Fig. VIII *n*). Der Farbenunterschied ist aber ein sehr schwacher. Nach etwa 60 Minuten langem Verweilen in absolutem Alkohol ist die Entfärbung so weit fortgeschritten, daß die Stäbe nur noch halbviolett gefärbte (Cystoplasma) und ganz ungefärbte Abschnitte (Glykogen) zeigen (Fig. VII *o*, *p*).

Sporangien (aus 65 Stunden alter Kultur). Dieselben färben sich ebenfalls stark. Bei der wie oben ausgeführten Entfärbung in Alkohol entfärben sich auch die Sporenanlagen oder behalten nur eine schwache Violettfärbung. Die Membran aller Entwickelungsstadien färbt sich mit und bleibt gefärbt. Die äußere Schleimschicht der Membran, welche die bestimmten Zwischenräume zwischen den aneinander liegenden Bakterien verursacht, färbt sich auch hier nicht. Diese Zwischenräume verschwinden auch hier sofort nach Zusatz von Karbolfuchsin. Sie werden aber nicht rot gefärbt, sondern die Stäbe schließen sich aneinander, Membran an Membran.

Degenerationsformen. Nach Gram gefärbte Präparate aus 8—10 Tage alten Agarkulturen, oder noch besser aus Kulturen, die ich durch Ueberimpfen eines auf Agar seit wenigen Tagen kräftig wachsenden Materials auf Dextroseagar mit 4 Proz. Kochsalz erhielt, ergeben folgende eigenartige Bilder. Man sieht erstens Stäbe, deren Inhalt völlig und gleichmäßig blauschwarz gefärbt ist (Fig. IX *f*); dann solche, die blauschwarze Körner und Klümpchen in ihrem Innern zeigen, während der übrige Inhalt und die Membran ungefärbt sind (Fig. IX *g*, *h*), und schließlich völlig ungefärbte Stäbe (hier und da noch mit schwach lichtbrechender Körnelung im Innern). Nach 30 Minuten langer Entfärbung in absolutem Alkohol ist die Färbung bis auf vereinzelte matt oder fleckig gefärbte Stäbchen verschwunden. Die lichtbrechenden Körner, welche jetzt nach der Entfärbung sichtbar geworden sind, sind nur in Wasserpräparaten zu sehen, nicht in Kanadabalsam. Auch andere Präparate von diesem Material sind nach $^1/_2$ Stunde langem Verweilen in Alkohol völlig entfärbt. Bei Verwendung von frischem, 24 Stunden alten cohaerens-Material sind dagegen die Stäbchen nach $^1/_2$-stündigem Verweilen in absolutem Alkohol noch sehr kräftig blauschwarz gefärbt, abgesehen von einzelnen plasmafreien Stäben und Fäden, die sich auch in den gebräuchlichen Anilinfarben schlecht gefärbt hätten. Bei Anwendung der Günther'schen Modifikation, welche darin besteht, daß die Präparate aus der Jodlösung während 10 Sekunden in 3-proz. Salzsäurealkohol getaucht und dann bis zum Farbloswerden in absolutem Alkohol abgespült werden, entfärben sich jedoch jene Degenerationsformen vollständig. Die oben (p. 12) gemachte Erfahrung, daß Fuchsin die Membran der degenerierten Stäbchen ziemlich gut färbt, setzt uns in den Stand, eine Doppelfärbung hervorzurufen, welche die rote Membran und die nach Gram gefärbten Plasmareste in schöner Weise zur Anschauung

bringt (Fig. IX *i'*, *i''*). Ich verfahre in der Weise, daß ich zu dem nach der Gram'schen Methode behandelten Präparate Fuchsinlösung 1 + 10 seitlich zulaufen lasse, nach kurzer Einwirkung mit Wasser nachspüle und, wenn nötig, nach schneller Trocknung in Balsam einschließe. Die in der Fuchsinlösung oder Wasser liegenden Präparate kann man nur kurze Zeit beobachten, da die blauschwarze Protoplasmafärbung (des Gram'schen Verfahrens) in diesen Flüssigkeiten ausgelöst wird und nur die Fuchsinfärbung zurückbleibt. Auch beim Färben der Membran in erwärmter Farblösung wird die blaue Gram-Farbe sehr schnell gelöst. Durch erneute Färbung nach dem Gram'schen Verfahren kann man aber an demselben Präparate die blauschwarze Farbe der Plasmareste wieder hervorrufen.

III. Untersuchung der fixierten und gefärbten Präparate in Kanadabalsam.

Von den in Kanadabalsam eingeschlossenen Stäbchen zeigen, abgesehen von den Veränderungen, die allen Balsampräparaten gemeinsam sind und die schon bei B. tumescens erwähnt wurden, nur die Ruhestäbe eine besonders bemerkenswerte Eigentümlichkeit. Während, wie es in Kanadabalsam zu erwarten war, die Dicke der Stäbchen im allgemeinen sich verringert hat, haben diejenigen Stellen, welche von der Anilinfarbe schwächer als der übrige Protoplast gefärbt sind (Glykogen), ihre ursprüngliche Breite fast überall behalten (Fig. VII *e*, *f*, *g*, *k*, *l*, *m*). Es bleibt sich gleich, ob die Präparate mit Fuchsin oder Methylenblau gefärbt werden; nur tritt nach der Fuchsinfärbung diese Veränderung schärfer hervor als nach der Behandlung mit Methylenblau. Naturgemäß ist diese Erscheinung nur da besonders auffallend, wo ein größerer Bezirk das Plasma gleichmäßig hell gefärbt erscheint. Kleinere Flecke oder gar Punkte haben auf die Gestaltung der Zelle keinen merklichen Einfluß (Fig. VII *m''*). Da häufig jene Zellabschnitte polar liegen, bekommen viele Bacillen eine trommelschlägelähnliche Form (Fig. VII *e*, *f*, *g*, *k*, *l*, *m'*).

(Fortsetzung folgt.)

Ueber ein neues alkohol- und säurefestes Stäbchen.

[Aus der bakteriologischen Station der Stadt Odessa.]

Von Dr. med. und Dr. phil. **Olschanetzky**,
Sanitätsarzt in Cavak bei Konstantinopel (Anatolien).

Zu den interessantesten Entdeckungen auf dem Gebiete der Morphologie der Bakterien in den letzten Jahren gehören unzweifelhaft die Mikroorganismen, die dem Tuberkelbacillus ähnlich sind.

Andererseits aber haben die Entdeckungen von säurefesten, tuberkelbacillenähnlichen Mikroorganismen es auch unmöglich gemacht, den Tuberkelbacillus ohne weiteres unter dem Mikroskope als solchen zu diagnostizieren, während bis dahin jedes absolut säure- und alkoholfeste Stäbchen als Tuberkelbacillus angesprochen wurde.

Eine Erklärung, worauf das Wesen der Säurefestigkeit beruht, wurde seiner Zeit von Robert Koch gegeben, und zwar vermutet er, daß die Tuberkelbacillen von einer Hülle umhüllt sind, welche das Ein-

dringen der Farbstoffe unter gleichzeitiger Einwirkung von Alkalien, Anilin gestattet, für Säuren dagegen mehr oder weniger undurchgängig ist. Gabritschewski[1]) sucht den Grund der Säurefestigkeit in dem Gehalte an fetten Säuren und ihren Verbindungen mit höheren Alkoholen (Wachs).

Wodurch nun auch die Säurefestigkeit beim Tuberkelbacillus bedingt sein mag, jedenfalls ist es wohl eine berechtigte Annahme, daß das gleiche tinktorielle Verhalten der übrigen säurefesten Bakterien, d. h. die Färbung mittels basischer Anilinfarbstoffe gegenüber der Einwirkung mineralischer Säuren zu bewahren, die sowohl den lebenden wie den abgetöteten Tuberkelbacillen zukommt, in einer gleichen resp. ähnlichen Ursache begründet ist.

Diese gemeinsame Farbenreaktion bildet aber nun gleichsam das äußere Band, welches alle zusammenhält. — War also früher noch jedes säurefeste Stäbchen als Tuberkelbacillus bezeichnet, so wissen wir heute durch die Arbeiten vieler Forscher, wie Petri[2]), Rabinowitsch[3]), Moeller[4]) etc., daß in der Natur noch andere säurefeste Arten vorkommen.

Andererseits aber giebt es eine ganze Reihe von Mikroorganismen, die nach ihren morphologischen Kennzeichen der Gruppe der Diphtherideen nahe stehen und, ähnlich einigen Vertretern dieser Gruppe, eine partielle Säureresistenz besitzen, wie es z. B. bei dem Czaplewski'schen Lepra-[5]) sowie dem Smegmabacillus[6]) der Fall ist. — Ganz neuerdings teilte auch Lichtheimer[7]) aus der Leyden'schen Klinik in Berlin in einer vorläufigen Mitteilung einen Fall mit, wo er aus dem Sputum eines tuberkuloseverdächtigen Kranken ein säurefestes Bakterium züchtete, welches sich vom Tuberkelbacillus dadurch unterscheidet, daß es zwar säurefest war, ihm jedoch jede Alkoholbeständigkeit fehlte; schon ein stundenlanges Verweilen im Alkohol genügte, um es völlig zu entfärben.

Das Bakterium, zu dessen Beschreibung wir jetzt übergehen, gehört, wie wir bald sehen werden, in morphologischer und biologischer Hinsicht gerade in diese Gruppe der partiellen Säurefestigkeit.

Gelegentlich mehrfacher, seit November vorigen Jahres auf der hiesigen bakteriologischen Station durch Herrn Dr. Skschivan vorgenommener Untersuchungen von Ratten auf Pesterkrankung wurde unter anderem konstatiert, daß ein bedeutender Prozentsatz derselben, und zwar hauptsächlich *Mus decumanus* (rat d'egout der Franzosen), außer der Pest an verschiedenen anderen Krankheiten leidet, wie Coccidiose, Bandwurm der Leber, der Lungen etc.

Unser Bakterium wurde ebenfalls aus dem Eiter eines großen Leberabscesses einer auf die Station gebrachten *Mus decumanus* isoliert. Es zeigte sich auf Strichpräparaten, die mittels wässeriger Methylenblaulösung gefärbt waren, als dünnes Stäbchen und erwies sich, auf Agar gesät, in seinem tinktoriellen Verhalten als ein dem „Leprabacillus"

1) Gabritschewski, Russisches Archiv f. Pathol. Bd. X. 1900. p. 373.
2) Petri, Arbeiten aus dem kaiserl. Gesundheitsamte. Bd. XIV. 1898.
3) Rabinowitsch, Deutsche med. Wochenschr. 1900. No. 16.
4) Moeller, Therapeutische Monatshefte v. Liebreich. 1898. Nov.; Centralbl. f. Bakt. etc. 1. Abt. Bd. XXV. 1899. No. 11; ibid. Bd. XXX. 1901. No. 14.
5) Czaplewski, Centralbl. f. Bakt. etc. 1. Abt. Bd. XXIII. 1898. No. 3/4.
6) Fraenkel, C., Centralbl. f. Bakt. etc. 1. Abt. Bd. XXIX. 1901. No. 1.
7) Lichtheimer, Deutsche med. Wochenschr. 1902. No. 13.

von Czaplewski ähnlicher Mikroorganismus, nämlich als ein Bakterium, welches teilweise säure- und alkoholfest ist.

Da der Gedanke nahe lag, daß diese Stäbchen die Ursache der Absceßbildung sind, wurde auf schrägen Agar geimpft, und schon am nächsten Tage war ein charakteristisches Wachstum zu sehen. Diese Kultur wurde nun auf Agarplatten in Petri-Schalen übersät, so daß alle folgenden Beobachtungen an der Kultur, die aus einer Kolonie stammten, ausgeführt wurden.

Das Stäbchen wuchs sehr gut auf allen gebräuchlichen Nährmedien, wie Agar, Agarglycerin, geronnenem Ochsenserum, Glycerinblutserum, Milch, Bouillon, Kartoffel und Gelatine. Schon nach 24 Stunden wird eine sehr reiche Kultur erhalten, wobei unter dem Mikroskope eine Mannigfaltigkeit der Formen, je nach dem Nährboden, beobachtet wird. Nur auf sauerem Agar mit Zucker habe ich kein Wachstum beobachtet, auch nicht bei längerem Stehen im Brütofen.

Außer den Stäbchen, die am schönsten in der Milch zu sehen sind und welche hier in Bündelform geordnet liegen, kommen viele V-Formen, sowie Kolben- und Hantelformen und Verzweigungen vor. Die V-Formen und Verzweigungen sind sehr schön im Agar mit 3-proz. ClNa zu sehen, welche von Skschivan[1]) als vorzügliches Reaktiv zur Konstatierung der Verzweigungen bei den Bakterien empfohlen wird. Eine Mannigfaltigkeit der Verzweigungen habe ich aber auch auf Gelatine erhalten. Kolben- und Hantelformen sind sehr schön entwickelt auf Ochsenserum und Glycerinochsenserum. Auf Ochsenserum ist aber auch andererseits eine deutliche fadenförmige Ausbildung der Stäbchen zu konstatieren, und zwar je älter die Kultur und je öfters eine Ueberimpfung auf dasselbe Medium stattfand, desto ausgeprägter.

Das sind die morphologischen Eigenschaften unseres Stäbchens. Als andere Eigenschaften seien angeführt: Das Stäbchen ist nicht beweglich, es läßt sich sehr gut färben durch Anilinfarben, sowie auch nach Gram, bei welcher Färbung die Stäbchen viel dünner sind als die mit Karbolfuchsin gefärbten; bei Methylenblaufärbung sind die Stäbchen noch feiner.

Auf die deutliche Körnchenfärbung nach Neisser und Piorkowski[2]) möchte ich besonders hinweisen.

Nach Ziehl-Neelsen gefärbt, verhält es sich tinktoriell dem Czaplewski'schen „Leprabacillus" ähnlich, indem nämlich ein Teil der Stäbchen teilweise die Säurefestigkeit behält, besonders deutlich aber färben sich nach Ziehl-Neelsen die Körnchen, welche sich bei anderen Präparaten nach Neisser und Piorkowski färbten. Die Resistenz des fraglichen Bakteriums gegen Entfärbung ist ziemlich stark. Am wenigsten eingreifend ist die Entfärbung mit Alkohol, dann die mit 5-proz. Schwefelsäure; viel eingreifender erwies sich die Kombination von 5-proz. Schwefelsäure mit nachfolgender Alkoholbehandlung, aber auch bei dieser Art von Entfärbung bleiben noch sehr viele Körnchen, die die Färbung zurückbehalten.

In alten Kulturen werden nach Ziehl auch sehr viele ganze Stäbchen gefärbt, in jüngeren Kulturen treten bei dieser Färbung nur gekörnte Stäbchen auf. Kulturen auf Kartoffel dagegen gaben folgenden Befund: Hier war die Säurefestigkeit bei jüngeren Kulturen deutlich,

---

1) Skschivan, Centralbl. f. Bakt. etc. 1. Abt. Bd. XXVIII. 1900. No. 10/11.
2) Piorkowski, Berl. klin. Wochenschr. 1902.

dagegen verloren sie schon bei einer 10-tägigen Kultur diese Eigenschaft vollkommen, sowie auch die Stäbchen selbst zu zerfallen beginnen.

Das Stäbchen wächst auch sehr gut anaërob.

Es besitzt die Fähigkeit eines schnellen und reichlichen Wachstums. Das Optimum des Wachstums liegt bei 37° C; bei einer Temperatur von 10—12° C ist das Wachstum sehr langsam.

In saueren Medien wächst das Stäbchen nicht.

Beim Aufsäen auf Medien, die Trauben-, Rohr- oder Milchzucker enthalten, ruft das Stäbchen keine Bildung von Gasblasen hervor.

Die Indolreaktion ist negativ. Was das Ertragen von hoher Temperatur anbelangt, so ist das Bakterium nicht resistenzfähig; bei 70° C sterben die Kulturen schon nach 2 Minuten, beim Kochen fast momentan ab.

In verschiedenen Medien zeigt unser Stäbchen folgende Eigenschaften des Wachstums:

Schräger Agar: Perlenartige runde Auflagerungen, durchsichtig; nach 48 Stunden werden die Auflagerungen größer, saftiger, doppelschichtig, undurchsichtig. Nach und nach gehen die einzelnen Perlen ineinander über, die Kultur sieht dann milchweiß und fett aus, an den Rändern noch einzelne Perlchen makroskopisch zu sehen. Die Kultur hat einen kommaartigen Ausläufer zum Kondenswasser, also die Eigenschaft eines Kriechbacillus. Kondenswasser nicht getrübt, mit einem staubkörnigen Niederschlage, auch oberhalb des Kondenswassers schwimmen einzelne Körnchen herum.

Agarstich: Längs des Impfstiches bis auf den Boden des Probierröhrchens kräftiges Wachstum von grauweißer Farbe. Nach ein paar Tagen bedeckt sich die Oberfläche mit einem feinen, weißen, nicht charakteristischen Belag.

Agarplatten: Kleine, erhabene, rundliche Kolonieen von tautropfweißer bis grauweißer Farbe.

Bei schwacher Vergrößerung: 1) Aufliegende Kolonieen durchscheinend, farblos, mit einem leichten Stich ins Gelbliche, gelappt und feinkörnig. 2) Tiefliegende Kolonieen sind scharf begrenzt, von goldgelber Farbe — in der Mitte dunkler als an den Rändern — von ovaler bis runder Form, feinkörnig.

Glycerinagar: Wachstum wie auf Agar, nur viel reicher und saftiger.

Agar mit 3-proz. ClNa: Sehr gutes Wachtum.

Gelatine wird nicht verflüssigt. Wachstum sehr langsam.

Gelatinestich: Im Stichkanal fadenförmiges, schwaches Wachstum, weiß, durchsichtig. Auf der Oberfläche keine Auflage.

Gelatinestrich: Entlang des Striches ein deutliches, aber langsames Wachstum von milchweißer Farbe, fettglänzend.

Gelatineplatten: Erst am 11. Tage wurden Kolonieen wahrgenommen von runder Form. Ränder abgegrenzt, hellgelb in der Mitte bis goldgelb an den Rändern, sehr feinkörnig.

Bouillon (Glycerinbouillon): Auf Bouillon übertragen, bewirkt unser Stäbchen eine gleichmäßige Trübung des Nährbodens schon nach 24 Stunden und bildet einen weißen, ziemlich großen Niederschlag. der sich schwer vom Boden aufwirbeln läßt und sofort wieder zu Boden fällt. Nach längerem Stehen wird der Niederschlag zu einer Art zusammenhängendem Häutchen, welches fest an der Bodenwand anhaftet.

Nach 4-tägigem Stehen im Thermostaten beginnt eine deutliche Häutchenbildung an der Oberfläche des Nährbodens, welches seinerseits, auf Bouillon übertragen, schon nach 24 Stunden Häutchenbildung ohne Bouillontrübung giebt. Die Trübung der Bouillon und Bildung eines Niederschlages tritt in diesem Falle erst am 3.—4. Tage ein.

Milch: In der Milch wächst unser Stäbchen ziemlich gut, bringt dieselbe nicht zum Gerinnen. Am 5. Tage merkbare, sehr schwach sauere Reaktion. Am Boden des Gefäßes reichlicher grauweißer Niederschlag.

Kartoffel (Glycerinkartoffel): Auf Kartoffeln bildet sich dem Striche entlang schon nach 48 Stunden eine dünne, etwas erhabene, ins Weiße schimmernde Kolonie, die fest an der Kartoffel anhaftet, trocken ist und sich hart anfühlt.

Serumnährböden: Wir verwendeten nur geronnenes Ochsenserum, sowie geronnenes Ochsenserum mit Glycerin. Auf diesen Nährböden war schon nach 24 Stunden ein üppiges Wachstum, welches sehr saftig und dem Stiche entlang begrenzt war; doppelschichtige Auflagerungen, Kondenswasser nicht getrübt.

Präparate aus diesen Medien nach Ziehl-Neelsen gefärbt, gaben am meisten säurefeste Stäbchen, und zwar ist dies je älter die Kultur, desto ausgesprochener zu sehen. Daraus nehmen wir mit Recht an, daß für unser Stäbchen Ochsenserum das beste Medium zur Entwickelung von säurefesten Bacillen ist, im Gegensatze zu Milch, welche körnchenlose Formeu giebt.

Zum Schlusse möchte ich noch besonders darauf hinweisen, daß unser Stäbchen nicht nur, nach der Ziehl-Neelsen'schen Methode gefärbt, die Resistenzfähigkeit gegen Entfärbung behält, sondern auch diese Eigenschaft bei Präparaten, die gefärbt mit wässeriger Methylenblaulösung und mit Alkohol, sowie mit 5-proz. Schwefelsäure entfärbt sind, behält, eine Eigenschaft, die ich ebenfalls bei dem Czaplewskischen „Leprabacillus“, welchen ich mit wässeriger Methylenblaulösung färbte und mit Alkohol, sowie 5-proz. Schwefelsäure entfärbte, konstatieren konnte.

Was nun die pathogene Wirkung unseres Stäbchens anbetrifft, so sei vorläufig angegeben, daß dasselbe auf Ratten pathogen wirkte, indem eine Bauchfellinjektion der Kultur in der Bauchhöhle chronische Abscеßbildung zur Folge hatte mit Verdickung und Verwachsung des Epiploons mit der Leber, dem Magen und der Milz.

Die Milz stark vergrößert, Kapsel trübe, Gewebe weich.

Leber und Nieren parenchymatös.

Lungen normal.

Inguinaldrüsen vergrößert.

Ein näheres Studium des Charakters dieser Veränderungen behalten wir uns vor.

Resumieren wir nun alles Besprochene, so sehen wir:

1) Daß das beschriebene Bakterium vor allem die Eigentümlichkeit des ausgesprochenen Pleomorphismus besitzt und Verzweigungen bildet;

2) bei Bauchfellinjektion pathogen auf Ratten wirkt.

3) In künstlichen Kulturen hat unser Stäbchen eine partielle Alkohol- und Säurefestigkeit, ausgenommen auf Kartoffel, auf welcher es diese Eigenschaft in älteren Kulturen verliert, und auf Milch, wo das Stäbchen körnchenlos sich fortpflanzt.

4) Durch ihre partielle Säurefestigkeit einerseits und durch ihre

morphologischen Eigenschaften und Streptothrix-Natur andererseits nimmt unser Stäbchen also höchst wahrscheinlich einen Platz auf der Grenze der Myko- und Corynebakterien ein.

Herrn Dr. Diatroptoff, Vorstand, und Herrn Dr. Skschivan, Sekundärarzt der Station, für das liebenswürdige Entgegenkommen, sowie Anregung und Ueberlassung des Materials der Arbeit an dieser Stelle meinen innigsten Dank auszusprechen, gereicht mir zur Freude.

Odessa, den 1./14. April 1902.

Zur Aetiologie des Keuchhustens.

Erwiderung an Herrn Prof. Livio Vincenci in Sassari (Sardinien).

[Aus dem Allgemeinen Krankenhause Hamburg-Eppendorf.]

Von **Georg Jochmann** (Hamburg-Eppendorf) und **Paul Krause** (Breslau).

Im Centralbl. f. Bakt. etc. I. Abt. 1902. No. 7 vergleicht Vincenci einen von ihm als Keuchhustenerreger aufgefaßten und in der D. med. Wochenschr. 1898. No. 40 beschriebenen Coccobacillus mit dem von uns beschriebenen influenzaähnlichen Stäbchen, das wir Bac. pertussis Eppendorf nannten, zum Unterschiede von früher beschriebenen Bacillen, denen die Aetiologie des Keuchhustens zugeschrieben wurde.

Er kommt dabei zu dem nach seinen Ausführungen für uns etwas erstaunlichen Resultat, daß diese beiden Bacillen identisch seien.

So erfreulich es nun im Interesse einer endgiltigen Klärung der Frage nach der Aetiologie der Tussis convulsiva wäre, wenn die Untersuchungen verschiedener Autoren identische Resultate zeitigten, so ist es uns leider doch unmöglich, die Behauptungen Vincenci's zu Recht bestehen zu lassen.

Wir müssen im Gegenteil die Ansicht Vincenci's, sein Coccobacillus sei dasselbe wie unser Bac. pertussis Eppendorf, als vollkommen unbegründet ablehnen, und zwar aus folgenden Gründen:

Der Unterschied der beiden Bacillen liegt in ihrem biologischen Verhalten. Wir haben ausdrücklich darauf hingewiesen und immer wieder betont, daß der Bac. pert. Eppend. ebenso wie der Influenzabacillus absolut auf hämoglobinhaltige Nährböden angewiesen sei. Es mag mitunter gelingen, wenn das ausgesäte Sputum bluthaltig ist, wie es bei Keuchhustenkindern oft vorkommt, auf gewöhnlichem Glycerinagar ein kümmerliches Wachstum des Bac. pert. zu erzielen, aber eine Weiterzüchtung gelingt nur auf Blutagar, niemals auf hämoglobinfreien Nährböden.

Im Gegensatz dazu gedeiht der Vincenci'sche Coccobacillus auf gewöhnlichem Agar, auf Bouillon, die er trübt und auf Milch, die er zur Gerinnung bringt.

Vincenci sucht nun trotzdem eine Identität zwischen den beiden, in ihrem biologischen Verhalten so himmelweit divergierenden Bacillen zu erzwingen, indem er folgendermaßen vorgeht:

Er legt den Schwerpunkt seiner Beweisführung darauf, daß wir das Keuchhustensputum vor der Aussaat in sterilem Wasser auswaschen,

um es von den üppig wuchernden Mundbakterien zu befreien, während er den Auswurf direkt, ungewaschen, zur Aussaat bringt.

Er sagt: „In den von mir ausgewählten Kranken war das Sputum nie ohne Spuren von Blut, d. h. es enthielt schon in sich den Nährstoff für das Wachstum des genannten Eppendorfer Bacillus ... Wenn Jochmann und Krause das Keuchhustensputum ordentlich waschen und keine Kolonieen ihres Bacillus auf gewöhnlichem Agar bekommen, so können sie doch nicht behaupten, daß dasselbe Resultat auch mit dem direkt auf Agar ausgestrichenen Sputum zu erwarten ist. Und sind die Kolonieen des kleinen ovalen Stäbchens auf gewöhnlichem Agar gewachsen (mit Hilfe ihres naturellen unveränderten Nährbodens, d. h. des Sputums selbst), so sind Jochmann und Krause nicht berechtigt, zu sagen, daß weitere Ueberimpfungen auf Agar, Bouillon etc. nicht gelingen können.“

Wir hatten schon in unserer Arbeit (Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. Bd. XXXVI. Heft 2) darauf aufmerksam gemacht, daß wir das Auswaschen des Sputums für erforderlich halten, weil es sicherer zum Ziele führt, indem die Mundbakterien ausgeschaltet werden. Nachdem wir die Untersuchungen weiter fortgeführt haben und jetzt über die Untersuchungsergebnisse der Auswürfe von nahezu 100 Keuchhustenkindern verfügen, müssen wir unbedingt jene Angabe aufrecht erhalten.

Aber Vincenci schreibt weiter: „Wissen die Autoren vielleicht nicht, was für einen bedeutenden Einfluß auf das Leben der Bacillen die verschiedenen Nährböden haben, und gerade die erste angewandte Nährsubstanz?“

Gewiß, das ist uns nicht unbekannt; nun beweist uns aber Vincenci vorher, daß alle von ihm untersuchten Keuchhustensputa, die er auf gewöhnlichem Agar aussäte, Blut enthalten haben. Diejenigen Kolonieen, die er dabei erzielte, sind also auf einem hämoglobinhaltigen Medium gewachsen und befinden sich daher bezüglich „der ersten angewandten Nährsubstanz“ genau in derselben Lage, wie die Kolonieen des Bac. pertussis, die wir auf Blutagar nach vorherigem Auswaschen des Sputums erhielten. Wenn nun die Kolonieen des Eppendorfer Bacillus sich niemals auf hämoglobinfreien Nährböden weiter züchten ließen und der Vincenci'sche Coccobacillus bei dem Versuch der Fortzüchtung stets auf gewöhnlichem Agar, Milch und Bouillon gedieh, so kann doch wohl von einer Identität der beiden keine Rede sein.

Auf Vincenci's Vorschlag hat jedoch der Eine von uns nochmals in einer größeren Anzahl von Fällen versucht, auch mit ungewaschenem Sputum und auf gewöhnlichem Agar zum Ziele zu kommen. Bei bluthaltigem Auswurf ist es uns gelungen, neben einer üppigen Flora von Mundbakterien auch Kolonieen von Bac. pertuss. Eppend. auf gewöhnlichem Agar zu bekommen, und das war bei dem Blutgehalt des Sputums ja auch nichts Besonderes, aber eine Weiterzüchtung des Eppendorfer Keuchhustenbacillus auf hämoglobinfreien Nährböden ist uns nie geglückt.

Der Eine von uns (Jochmann) hat bisher 70 verschiedene Stämme des Bac. pertuss. Eppendorf isoliert, bei jedem einzelnen Stamme Weiterzüchtungen auf Blutagar vorgenommen und gleichzeitig stets Uebertragungen auf hämoglobinfreie Nährböden versucht. Während auf Blutagar stets eine üppige Reinkultur von Bac. pertussis wuchs, blieben die gewöhnlichen Agarplatten, sowie Milch und Bouillon immer steril.

Wir haben also wohl eine gewisse Berechtigung, als eine Thatsache hinzustellen, daß der Bac. pertussis Eppendorf nur auf hämoglobinhaltigen Nährböden gedeiht, und diese Thatsache wird Herr Vincenci durch einige gekünstelte Ueberlegungen, die er sich am Schreibtisch ausdenkt, nicht umstoßen.

Wir bezweifeln keinen Augenblick, daß Vincenci die von uns beschriebenen influenzaähnlichen Stäbchen in Ausstrichpräparaten von Keuchhustensputum gesehen hat, aber der von ihm, wie er berichtet, 18mal isolierte Coccobacillus ist biologisch völlig verschieden von unserem Bac. pertussis Eppendorf.

Ueber das Verhalten der 70 im Eppendorfer Krankenhause isolierten Stämme unseres Keuchhustenbacillus, über sein Vorkommen in bronchopneumonischen Herden von Keuchhustenkindern, wo er in 20 Fällen meist in Reinkulturen gefunden wurde und über seine Beziehungen zur Aetiologie des Keuchhustens wird der Eine von uns binnen kurzem berichten.

Zur Entstehung von Rattenepizootieen.

[Aus dem bakteriologischen Laboratorium an der K. k. landwirtschaftlich-bakteriologischen und Pflanzenschutzstation in Wien.]

Von Dr. **E. Wiener.**

In der Münchener medizinischen Wochenschrift[1]) wurde ein einfaches Verfahren zur Steigerung der Virulenz des Danysz'schen Bacillus[2]) angegeben. Bei der Vorliebe dieser Bacillenart für alkalisierte Nährböden gelingt es nämlich, die Virulenz wenig giftigen Materiales durch Aussäen in ein frisches, unbeschädigtes rohes Ei, dessen Inhalt man vorher durch einige Tropfen sterilisierter 1-proz. NaOH-Lösung alkalisch gemacht hat, bei mehrtägigem Verweilen im Brutschrank derart zu steigern, daß man mit demselben nunmehr bei Ratten per os eine in wenigen Tagen letal endigende Allgemeininfektion hervorzurufen vermag. Man nimmt hierzu am besten 1 Tag alte Agarkulturen, welche in Bouillon aufgeschwemmt und in welcher dann die zu verfütternden Brotstücke getränkt werden. Es sei hier bemerkt, daß derart virulent gemachte Agarkulturen in vielen Fällen an Interessenten seitens der Station mit einer beigegebenen Belehrung über die Behandlung der Kulturen verabfolgt wurden. Die Ausgabe von Bouillonkulturen wurde eingestellt, da die Behandlung derselben seitens des Laienpublikums fast niemals richtig erfolgte, die Kulturen am Bestimmungsorte angelangt zumeist unvorsichtig geöffnet wurden und alsbald faulten.

Mittlerweile hat Issatschenko[3]) einen weiteren Beitrag zu seinem im Jahre 1898 beschriebenen[4]) rattenpathogenen Bacillus geliefert. Dieser Bacillus, welcher ebenfalls der Coligruppe nahesteht, auf den meisten üblichen Nährböden gleich diesem gedeiht, wurde zufällig ge-

---

1) 1902. p. 401.
2) Annales de l'Institut Pasteur. 1900. p. 193.
3) Centralbl. f. Bakt. etc. Abt. I. Bd. XXXI. p. 36.
4) Ibid. Bd. XXIII. p. 873.

legentlich einer Rattenepizootie, welche im Laboratorium der Ackerbauministeriums in St. Petersburg ausbrach, reingezüchtet. Issatschenko hat mir in liebenswürdigster Weise eine Kultur desselben überlassen.

I.

Nach Angabe Issatschenko's war der von ihm gefundene Bacillus blos für Ratten und Mäuse sehr virulent, für Haustiere dagegen nur in geringem Grade, so daß Katzen bei Darreichung von 100 ccm, Hunde bei 200, Hühner bei 30, Tauben bei 20 ccm Bouillonkultur keine Krankheitserscheinungen und nach 35—40-tägiger Beobachtung getötet, in den Organen keine Bakterien aufwiesen; selbst Katzen, welche mit infizierten lebenden und toten Mäusen gefüttert wurden, zeigten keine Krankheitserscheinungen, ebensowenig wie größere Haustiere und Geflügel, welche Feoktistoff[1]) mit geradezu enormen Mengen fütterte. Er gab einem Pferde $^1/_2$ l, je einem Ochsen, Schwein, Schaf und Hund 300, bezw. 400, 200 und 300 ccm, Truthühnern, Hühnern, Gänsen und Enten zwischen 20 und 50 ccm. Von diesen Tieren erkrankte bloß ein Ochs, ein Schaf und ein Schwein vorübergehend an Durchfall, während die übrigen gesund blieben.

Bei den von Issatschenko weiter verfolgten Versuchen wurden bis November 1900 443 Ratten infiziert, von welchen nur 12 überlebten; von diesen nimmt er an, daß sie refraktär waren. Die übrigen starben zwischen dem 2. und 90. Tage, darunter 84,2 Proz. während der ersten 15 Tage; die durchschnittliche Krankheitsdauer betrug 10,5 Tage. Während des Jahres 1899 allein hat das bakteriologische Laboratorium des russischen Ackerbauministeriums 788 l Bouillonkultur verabfolgt und sollen hierbei in 70,1 Proz. der Fälle günstige Ergebnisse erzielt worden sein.

Die mir übersandte Agarkultur war nach eigener Angabe Issatschenko's avirulent und gab er mir den Rat, die Virulenz durch einige Tierpassagen bei intraperitonealer Applikation zu steigern. Ich zog es vor, mich der bewährten Methode der Züchtung im alkalisierten Ei zu bedienen und das mit gutem Erfolge.

Die mit 18-stündigem direkt vom übersandten Materiale gezüchteten Agarkulturen infizierten Ratten zeigten weder nach Verfütterung, noch bei intraperitonealer oder subkutaner Injektion ganzer Kulturen irgend welche Krankheitserscheinungen. Diese blieben sogar aus, wenn durch mehrere aufeinanderfolgende Tage je zwei ganze Kulturen verfüttert wurden. Die Tiere fraßen das ihnen gereichte Futter und blieben munter.

Die den Bac. Issatschenko betreffenden Untersuchungen waren fast abgeschlossen, als Max Grimm[2]) seine vergleichenden Untersuchungen über den Bac. Danysz und über einen neuen für Ratten pathogenen Mikroben veröffentlichte. Der neue, von ihm Bac. septicaemiae murium nov. spec. benannt, ist mit dem von Issatschenko[3]) beschriebenen identisch und werden dessen Mitteilungen in einigen unwesentlichen Punkten ergänzt und die von Kulescha stammende pathologisch-anatomische Beschreibung beigefügt. Dieselbe

---

1) Jahresbericht des landwirtschaftlichen Laboratoriums in St. Petersburg. 1897. (Citiert nach Centralbl. f. Bakt. etc.)

2) Centralbl. f. Bakt. etc. Bd. XXXI. p. 286.

3) l. c.

war im Jahre 1899 in russischer Sprache erschienen [1]) und mir in meiner ersten bezüglichen Abhandlung nicht zugänglich, deckt sich jedoch in allen wesentlichen Punkten mit meinen Befunden. Die übrigen von Grimm hervorgehobenen Merkmale, welche den Bac. septicaemiae Issatschenko von dem Danysz' unterscheiden sollen, wie das Verhalten auf Agar- und Gelatineplatten, in der Stichkultur, Bouillon, Milch und auf Kartoffeln, sind so wenig charakteristisch, und wie jedermann weiß, der sich längere Zeit bakteriologisch beschäftigt hat, so wechselnd, daß sie kaum als Unterscheidungsmerkmale für Stämme derselben Art herangezogen werden können. Die von Grimm als wichtige differentialdiagnostische Merkmale angegebenen Erscheinungen bestehen nicht. So das Verhalten im Zuckeragar. Der Bac. septic. mur. soll in demselben „schwache Gasbildung und allmählich vollkommene Trübung des Agars bis zur Undurchsichtigkeit“ erzeugen, während der Bac. Danysz „sehr starke Gasbildung verursacht. Der Agar wird mit Gewalt in Stücke gerissen und oft bis zum Wattepfropfen heraufgestoßen“. Auch hier ist das Verhalten ein durchaus wechselndes. Die mir von Issatschenko übersandte Kultur verhielt sich im Zuckeragar wie eine sogenannte typische Typhuskultur, d. h. es war keine Spur von Gärung wahrzunehmen. Nach Züchtung durch das Ei zeigte sich dasselbe Verhalten wie von Grimm für den Bac. Danysz als charakteristisch angenommen, d. h. nach 3 Tagen Gasbildung bis zur vollkommenen Zerreissung des Zuckeragar; umgekehrt war die seiner Zeit eingelangte avirulente Danysz-Kultur sehr schwach gasbildend.

II.

Die mit dem Bac. Danysz wie dem Bac. Issatschenko vorgenommenen Versuche waren in einer Weise übereinstimmend und deren zweifellose Zugehörigkeit zur Typhuscoligruppe eine derartige, daß es nahe lag, zu prüfen, ob nicht mit einer autentischen Colikultur durch entsprechende Vorbehandlung eine derartige Anpassung an den Tierkörper, in diesem Falle an die Ratte, zu erzielen wäre, daß eine tödliche Infizierung bewirkt werden könne.

Bezüglich der Provenienz können die wenigsten Einwände erhoben werden gegen eine Colikultur, welche aus dem Säuglingsdarme stammt. Das Bact. coli commune ist in demselben häufig die einzige oder wenigstens bei weitem überwiegende Bakterienart, so daß die Beeinflussung durch Symbiose mit anderen Arten oder Verwechslung mit Bact. typhi weniger in Frage kommt; auch ist es zumeist hier harmlos saprophytischer Natur. Herr Prof. v. Escherich hatte die Güte, mir auf mein diesbezügliches Ersuchen eine aus dem Säuglingsdarme stammende Colikultur zu übersenden, wofür ich auch an dieser Stelle meinen verbindlichsten Dank abstatte. Ich gehe auf die nähere Beschreibung des Verhaltens auf den verschiedenen Nährböden nicht ein und bemerke nur im allgemeinen, daß er auf den meisten derselben jenes Verhalten zeigte, welches als „typisch“ anzusehen man sich gewöhnt hat; für Mäuse, Meerschweinchen und Ratten war es bei subkutaner und intraperitonealer Anwendung nicht infektiös.

Um Virulenz zu erzielen, wurde wieder die Eikultur versucht. Neben den bereits beschriebenen Methoden wurden bei Alkalisierung des Eies stärkere Verdünnungen von NaOH angewandt, zunächst ohne Effekt.

---

1) Archiv f. Veterinärwissenschaften. 1899. Juni. (Citiert nach Centralbl. f. Bakt.)

Erst als ich von der 3. Eikultur — jede war durch 7 Tage im Brutschrank gestanden und direkt von Ei zu Ei weitergeimpft — je 1—1$^1/_2$ Agarkulturen an mehreren aufeinanderfolgenden Tagen verfütterte, wurden die Ratten krank und gingen nach 15 bis 30 Tagen ein. Dabei ergab sich, daß hungernde Tiere, welche 24 Stunden vor der Infizierung weder Futter noch Wasser erhielten, der Infektion leichter erlagen als satte. Dies kann auf verschiedene Ursachen zurückzuführen sein. Zunächst darauf, daß die ausgehungerten und durstenden Tiere sofort die Flüssigkeitströpfchen auflecken und das mit Bouillonaufschwemmung getränkte Brot verzehren. Dadurch sind die Bakterien weniger der Gefahr ausgesetzt, durch die Säure des Brotes geschwächt oder getötet zu werden; die nicht ausgehungerten Tiere lassen das getränkte Brot häufig durch mehrere Stunden unberührt, während welcher Zeit nicht nur die Säure des Brotes ihren entwickelungshemmenden Einfluß ausüben kann, sondern die Bakterien auch durch Austrocknung leiden. Möglicherweise könnte dann noch bei hungernden Tieren die raschere Resorption und der Umstand mitwirken, daß im Magen keine Verdünnung des Bakterienmateriales durch Speisebrei stattfinden kann, was bei Tieren, die kurz vorher gegesssen haben, in Betracht zu ziehen ist.

Hohe Virulenz wurde bei Bact. coli erst erzielt, als die Alkalisierung des Eies mittels Ammoniak bewirkt wurde; am geeignetesten erwies sich, wie Komperativversuche zeigten, eine durch Verdünnung aus einer 24-proz. hergestellte 5—10-proz. Ammoniaklösung, von welcher 10—15 Tropfen in das Ei mittels ausgezogener, sterilisierter Pipette eingeblasen wurden. Schon nach eintägigem Verweilen im derart vorbehandelten Ei bilden die auf schwach alkalischem Agar gezüchteten Bakterien einen üppigen Rasen und waren sehr lebhaft beweglich. Die Virulenzsteigerung war nach 5—7-tägigem Verweilen im bebrüteten Ei am ausgesprochensten. Reinkulturen von solchen Eiern verursachten nach entsprechender Verfütterung bei Ratten schon nach wenigen Stunden Krankheitserscheinungen, welche a. O. beschrieben wurden und sich zunächst in Mattigkeit, Abnahme der Reflexerregbarkeit, gesträubtem Fell äußerten. Die Tiere fressen nichts, sind aber sehr durstig; sie lecken blos die Flüssigkeitströpfchen von ihrem üblichen, aus frischgekochtem Mais bestehenden Futter ab, lassen aber die Nahrung selbst fast unberührt und verenden innerhalb 3—14 Tagen. Manche erholen sich vorübergehend, um dann kachektisch zu werden, was sich in hochgradiger Abmagerung und Kahlwerden ausgebreiteter Hautpartieen äußert. Keines dieser Tiere überlebte die Infektion länger als 62 Tage. Dieser langsame Verfall tritt auch meist bei jenen Tieren ein, welche mit etwas weniger virulenten oder mit ungenügenden Mengen hochvirulenten Materiales infiziert wurden, in welchem Falle anfänglich Krankheitserscheinungen überhaupt fehlen können. Einige Tiere, welche 14 Tage nach der Infektion mit weniger virulentem Material anscheinend gesund waren, gingen 48 Stunden nach Fütterung mit Kulturen aus Ammoniakeiern ein.

III.

Die Differenzierung zur Trennung der Varietäten der Typhuscoligruppe wurde von zahlreichen Autoren versucht. In Betracht gezogen sind zumeist Unterschiede bezüglich der Toxicität, Virulenz, Gasbildung, Säurebildung, Verhalten auf Nährböden, Variationen in der Form und

in den letzten Jahren in erster Linie die Agglomeration der Bakterien. Nach Versuchen mit 30 Arten von Bact. coli kam Harris[1]) zu dem Schlusse, daß man nach der Toxicität derselben wohl 2 Arten von einander unterscheiden, nicht aber allgemein giltige Regeln aufstellen könne; 15 der von ihm untersuchten Arten waren überhaupt nicht toxisch.

Toxicität und Virulenz sind bei demselben Stamme einer fortwährenden Schwankung unterworfen; man kann dieselbe, wie eben gezeigt wurde, außerhalb des Tierkörpers und auch mit Hilfe der Tierpassagen erheblich steigern. Man kann sie beliebig vermindern durch thermische und chemische Einwirkung; sie gehen spontan durch Altwerden der Kultur verloren. Wenn wir demnach einen Colistamm zur Untersuchung bekommen, wissen wir nicht, unter welchen Lebensbedingungen derselbe früher gewachsen. So kamen uns manchmal Kulturen vor, wo langsames und spärliches Wachstum auf den Nährböden, geringe Beweglichkeit, Mangel oder geringe Intensität der sonstigen biologischen Eigenschaften, völlig fehlende Virulenz das nahe Absterben anzeigte und waren diese Kulturen auch durch keinerlei Züchtungsart mehr zu kräftigeren Lebensäußerungen zu bringen.

Daß die Gasbildung ein brauchbares Unterscheidungsmerkmal nicht abgeben könne, wurde oben erwähnt; ebenso wie manchmal Colikulturen keine Gasbildner sind, findet man umgekehrt gasbildende Typhusbakterien. Abel[2]) erwähnt die Eigenschaft der Typhusbacillen, kein Gas zu bilden, während Lembke[3]) sie blos im Zusammenhange mit anderen Merkmalen zur Sicherung des Erkennens der Typhusbacillen gelten lassen will. Thatsächlich kommen auch nicht gasbildende Coliarten vor, wie bei dem von Issatschenko mir übersandten Bacillus.

Auch die Differenzierung der Coli- und Typhusbakterien auf Grund verschiedener Säurebildung ist bisher noch nicht einwandfrei gelungen. Dagegen sprechen auch die Versuche von Capaldi und Proskauer[4]) nicht, welchen es erst mit Hilfe eines komplizierten Nährbodens gelungen war, nach 20-stündiger Bebrütung bei Typhusbakterien eine schwach sauere Reaktion zu erzielen, während die Colibakterien noch schwach alkalisch reagierten. Als Unterscheidungsmerkmal kann man dieses Verhalten bei dem Umstande, als auch die Intensität der Säurebildung fortwährenden Schwankungen unterworfen ist, nicht gelten lassen.

Einige Forscher wie Klie[5]), Pfaundler[6]) u.a. meinen, daß die Verschiedenheit der Bakterienform und des Aussehens der Kolonieen auf Gelatine und Agarplatten Unterscheidungsmerkmale zwischen Typhus- und Colibakterien nicht oder nur bedingungsweise abgeben können. Verschiedenheit der Nährsubstrate, des Alters, der Temperatur können die Form der Bakterien wesentlich beeinflussen. Colibakterien von normaler Größe erscheinen nach Züchtung im alkalisierten Ei bedeutend kleiner, züchtet man sie einige Zeit auf alkalischem Strichagar, so erlangen sie wieder die frühere Größe. Im Kondenswasser dieser Kulturen sind fast immer schon nach 24 Stunden längere Faden nachzuweisen. Man weiß, wie

1) Centralbl. f. Bakt. etc. 1901. p. 306.
2) Leitfaden. p. 63.
3) Zeitschr. f. Hyg. Bd. XXVI u. XXVII.
4) Zeitschr. f. Hyg. Bd. XXIII. p. 552.
5) Centralbl. f. Bakt. etc. 1896. p. 49.
6) Centralbl. f. Bakt. etc. 1898. p. 9ff.

langsam und unsicher Bakterien, welche durch irgend ein Agens abgeschwächt wurden, auf Plattenaussaaten wachsen; es wird auch auf das verschiedene Aussehen der Kolonieen auf Platten von vielen Forschern, insbesondere der französischen Schule, gar kein Gewicht mehr gelegt.

Als wichtigstes differenzierendes Merkmal gilt derzeit das Agglomerationsphänomen. Hochwertiges Typhusimmunserum, welches noch im Verhältnisse 1:1000 das Ausgangsmaterial agglomerierte, zeigte dieses Phänomen bei der Original-Issatschenko-Kultur noch bei 500-facher Verdünnung sehr schwach, bei stärkeren Verdünnungen nicht mehr; die Originalcolikultur bei derselben Verdünnung erst nach $^1/_2$ Stunde beginnend. Nach mehrfacher Passage durch den Rattenkörper fand die Agglomeration nur bei 5-facher Verdünnung statt. Dagegen wurden Typhusbakterien von dem Serum solcher Ratten, welche anfänglich mit weniger virulenten Coli- oder Issatschenko-Kulturen gefüttert wurden und erst nach mehreren Wochen starben, in sehr geringem Grade (1 : 1) agglomeriert. Aber schon als die Tiere nach 10-tägiger Krankheit eingingen, agglomerierte das Serum derselben Typhusbakterien bei 30—50-facher Verdünnung, woraus hervorgeht, daß auch die Eigenschaft der Agglomerationsfähigkeit eines Serums keine feststehende, für alle Fälle giltige ist, sondern in seiner Wirksamkeit variiert, je nachdem die Bakterien, auf welche es einwirkt, verschiedenen Lebensbedingungen angepaßt wurden.

Die hier angeführten Versuche kommen auch in epidemiologischer Hinsicht in Betracht. Sie zeigen, daß Rattenepizootieen unter Umständen durch Bakterien hervorgerufen werden können, welche von einer ursprünglich ganz harmlos saprophytischen Art stammen, aber durch das Zusammenwirken günstiger Bedingungen beträchtliche Virulenz erlangt hat. Finden derartige Bacillen Eingang in ein körperlich zu deren Fortkommen, sei es durch Hunger oder anderweitig gut disponiertes Individuum, so kann die Virulenz derart gesteigert werden, daß die Bedingungen für das Entstehen einer Epizootie nunmehr gegeben sind.

Experimenteller Beitrag zur Frage der Agglutination der Tuberkelbacillen und zur Behandlung der Tuberkulose mit Neu-Tuberkulin Koch (Bacillenemulsion).

[Aus dem Hygieneinstitute der Universität Zürich.]

Von **Fritz Thellung**, med. pract.,
gewesenem Assistenzarzt am Sanatorium du Montblanc in Leysin.

Von den verschiedenen Arbeiten, die seit den ersten Mitteilungen von Arloing und Courmont (1) über die Agglutination der Tuberkelbacillen erschienen sind, ist wohl die interessanteste diejenige von Robert Koch (2). Koch hatte gefunden, daß das Blutserum bei leichten, zur Genesung neigenden Fällen von Tuberkulose öfter agglutinierende Eigenschaften zeige, als bei schweren Formen. Er war geneigt, einer starken Agglutination eine günstige Bedeutung zuzu-

schreiben und in ihr den Ausdruck einer erfolgreichen Reaktion des Organismus gegen den Krankheitserreger zu sehen. Andererseits war es ihm gelungen, durch Injektion von zerriebenen Tuberkelbacillen bei Tieren hohe Agglutinationswerte zu erzielen. Er versuchte nun, durch diese künstliche Erzeugung resp. Steigerung der agglutinierenden Eigenschaften den kranken Organismus in seinem Kampfe gegen die Bacillen und deren Produkte zu unterstützen. Er benutzte eine Aufschwemmung von zerriebenen Tuberkelbacillen, brachte durch Injektionen steigender Mengen derselben bei einem großen Teile der so behandelten Patienten eine Steigerung resp. ein Auftreten der agglutinierenden Wirkung des Blutserums hervor und beobachtete parallel damit klinisch Besserung des Zustandes der Kranken. Auf Grund seiner Versuche empfiehlt er die genannte Aufschwemmung, das Neutuberkulin Koch (Bacillenemulsion) zur Behandlung der Tuberkulose.

Diese Mitteilung Koch's bildete die Veranlassung zu vorliegender Arbeit. Auf Anregung von Herrn Docenten Dr. Silberschmidt untersuchte ich — neben einigen Untersuchungen über den diagnostischen Wert der Agglutination — die Wirkungen des Neutuberkulins (Bacillenemulsion) auf einige gesunde und tuberkulös gemachte Meerschweinchen und Kaninchen. Dadurch suchte ich zu erfahren, ob sich eine experimentelle Stütze finden lasse für die Annahme, daß einer Steigerung der agglutinierenden Fähigkeit des Blutserums gegenüber Tuberkelbacillen eine Immunisierung gegen dieselben parallel gehe.

Arloing und Courmont verwenden zu ihren Agglutinationsversuchen „homogene“ Kulturen lebender Tuberkelbacillen, in denen die einzelnen Bacillen gleichmäßig in der Flüssigkeit verteilt sind und so durch geeignete Sera agglutiniert werden können. Koch fand, daß die Herstellung dieser Kulturen kompliziert und daß die Resultate nicht konstant, sondern von der Beschaffenheit der jeweilen verwendeten Kulturen abhängig seien, weshalb die Kulturen immer mit einem Serum von bekanntem Agglutinationswerte geprüft werden müssen. Er versetzte nun die Tuberkelbacillen auf andere Weise in einen agglutinierbaren Zustand: durch Zerreiben von trockenen Reinkulturen in Kugelmühlen und durch Aufschwemmen des so gewonnenen Pulvers in Wasser. Er erhielt so eine Testflüssigkeit, die sich ebensogut agglutinieren ließ wie die homogenen Kulturen, und ihm konstantere Resultate gab. Diese Koch'sche Agglutinationsflüssigkeit wurde bei den folgenden Untersuchungen fast ausschließlich benutzt.

Das zur Herstellung der Agglutinationsflüssigkeit verwendete Präparat: „Zerriebene Tuberkelbacillen“, von den Höchster Farbwerken bezogen, ist ein äußerst leichtes, feines, gelblich-weißes Pulver. Mikroskopisch sieht man in einem nach Ziehl-Neelsen gefärbten Präparate hauptsächlich durch Methylenblau gefärbte, körnige Massen und Detritus, sowie größere, farblose Schollen (Nährbodenbestandteile?). Außerdem vereinzelte kleine Gruppen von teils wohlerhaltenen, größtenteils aber sehr kurzen (wohl mechanisch zertrümmerten) säurefesten Bacillen.

Die Herstellung der Agglutinationsflüssigkeit erfolgte genau nach Koch's Angaben: Inniges Mischen eines Gewichtsteiles des beschriebenen Präparates im Achatmörser mit 100 Teilen Karbolkochsalzlösung (physiologische Kochsalzlösung mit 0,5 Proz. Phenol); dann

kräftiges Centrifugieren, Abgießen der Flüssigkeit vom Bodensatze und 10-faches Verdünnen mit Karbolkochsalzlösung. So erhält man opalescierende, homogene Stammflüssigkeit. Diese läßt sich bis 2 Wochen lang im Eisschranke aufbewahren, ohne alteriert zu werden. Nur scheidet sie sich im Laufe der 2. Woche in einen oberen, klareren und einen unteren, trüberen Teil, aber bei leichtem Schütteln tritt wieder innige Mischung ein.

Zum Gebrauche wird ein Teil dieser Flüssigkeit wieder 10mal verdünnt und man erhält so die Testflüssigkeit; diese ist, wie Koch es angiebt, ganz leicht opalescierend; mikroskopisch sieht man im hängenden Tropfen ganz wenig Detritus.

Zur Gewinnung des Serums für die Agglutinationsversuche wurde das Blut den Tieren durch Nadelstich aus den Ohrgefäßen entnommen. bei toten Tieren aus dem Herzen. 2 ccm genügen vollkommen zur Anstellung der Reaktionen. Das Blut wurde nach der Gerinnung meist centrifugiert (einfaches Stehenlassen im Eisschranke gab klares Serum, aber nicht in genügender Menge). Dann wurde das Serum sorgfältig abpipettiert, ein mittelst graduierter Pipette abgemessenes Quantum oder eine bestimmte Anzahl Tropfen in ein enges Reagenzröhrchen gebracht und dasselbe nach Hinzufügen der Testflüssigkeit in den Brütschrank gestellt.

Die Reaktion trat meist langsam ein, bis zu ihrer Vollendung vergingen etwa $1^1/_2$ Tage. Während des ersten halben Tages war in der Regel keine Veränderung zu sehen; dann trat allmählich eine gleichmäßige Trübung der Flüssigkeit ein. Es war dann einstweilen unmöglich, zu entscheiden, ob es sich um eine beginnende resp. nur angedeutete und nicht weiter fortschreitende Agglutination handelte oder um eine zufällige, durch das Serum bedingte Trübung. Wenn nämlich das Serum nicht vollständig klar gewonnen werden konnte, so trat meist nach einiger Zeit eine Trübung ein, die die Erkennung der Reaktion unmöglich machte. Das kam hie und da bei Kaninchen. aus unbekannter Ursache vor, sowie einige Male bei der Entnahme von Blut getöteter Tiere.

Schritt die Reaktion weiter vor, so trat die Bildung feinster Flöckchen ein, die sich, wie Koch angiebt, besonders gut erkennen lassen, wenn man das Röhrchen gegen einen dunkeln Hintergrund hält. Ich konnte sie im durchfallenden Lichte noch besser wahrnehmen.

Das erste Auftreten dieser feinen Flöckchen, das die Reaktion als positiv kennzeichnet, ist oft schwer zu erkennen.

Endlich folgte, aber nur, wenn die Reaktion stärker ausgesprochen war, die Vereinigung der feinen Flöckchen zu gröberen und das Zubodensinken derselben, so daß wieder eine Aufklärung der Trübung auftrat und sich ein Bodensatz bildete. Dieser letztere war wegen seiner lockeren, flockigen Beschaffenheit von zufälligen Verunreinigungen gewöhnlich leicht zu unterscheiden. — Die Reaktion wurde immer nur dann als positiv bezeichnet, wenn deutliche Flöckchen oder ein Bodensatz vorhanden waren.

Mikroskopisch fanden sich im Bodensatze körnige, lichtbrechende Massen, keine säurefesten Partikel. Die Diagnose der Agglutination nach dem mikroskopischen Bilde zu stellen, ist unzuverlässig; auch in Kontrollpräparaten fanden sich kleine Häufchen von Detritus.

Wurde die Testflüssigkeit durch ein Porzellanfilter filtriert, so trat

nachher bei Zusatz von wirksamem Serum die Reaktion nicht ein. Dagegen gelang es, in der filtrierten Stammflüssigkeit (die 10-mal konzentrierter ist) durch Hinzufügen von hochwertigem Serum eine deutliche, feinflockige Präzipitation zu erhalten.

Wird ein wirksames Serum vor der Reaktion 1 Stunde lang auf 56° C erhitzt, so tritt, wie dies auch Romberg (3) konstatierte, keine Agglutination ein, während im allgemeinen angegeben wird, daß Agglutinine bei dieser Temperatur nicht zerstört werden.

Ist eine Reaktion schwach ausgesprochen, so ist es wichtig, die vorgeschriebene Testflüssigkeit, nicht die Stammflüssigkeit zu nehmen. Unter mehreren Versuchen, die mit beiden Flüssigkeiten angestellt wurden, war in 2 Fällen die Reaktion bei Verwendung der dünneren Flüssigkeit positiv, bei der trüberen negativ.

Die Reaktionen wurden im allgemeinen im Verhältnis von 1 : 5 und 1 : 10 gemacht (1 Teil Serum auf 4 resp. 9 Teile Testflüssigkeit). War die Agglutination bei 1 : 10 vorhanden, so wurden höhere Verdünnungen gemacht. — Trat die Agglutination bei 1 : 10 auf, so war sie bei 1 : 5 meist stärker ausgesprochen, so daß der Ausfall der Reaktion bei 1 : 5 zuverlässig war. Romberg (3) fand, daß die Koch'sche Flüssigkeit bei 1 : 5 die Reaktion nicht deutlich erkennen lasse und deshalb für diagnostische Untersuchungen ungeeignet sei; er verwendet die Behring'sche Flüssigkeit, eine dichtere Emulsion von zerriebenen Tuberkelbacillen.

I. Diagnostische Versuche.

A. Versuche mit menschlichem Serum. Keine Agglutination zeigten: 1 Fall von Pneumonie, 1 Puerperalfieber, 1 Placentarblut.

Ein Fall von Tuberkulose der Harnblase reagierte negativ. Bei 10 Phthisikern[1]), die Bacillen im Sputum aufwiesen, trat in 4 Fällen die Agglutination ein, und zwar 3mal nur im Verhältnis von 1 : 5, 1mal auch bei 1 : 10. Letzterer Fall, und ebenso 2 weitere von den positiv reagierenden, war ein schwerer, der 4. ein leichter. Unter den 6 negativ reagierenden Fällen waren 3 schwere, 3 leichte.

B. Versuche mit dem Serum gesunder Tiere. Von 15 Meerschweinchen war bei 14 die Reaktion bei 1 : 5 negativ, bei 1 dagegen positiv.

5 gesunde Kaninchen reagierten negativ, bei 2 war kein völlig klares Serum erhältlich.

Die Sera eines Schweines und eines Rindes riefen keine Agglutination hervor.

C. Versuche mit tuberkulösen Tieren. Bei 13, meist schwer tuberkulösen (mit menschlicher Tuberkulose geimpften) Meerschweinchen war die Agglutination 9mal negativ; 4mal positiv, und zwar 3mal nur bei 1 : 5, 1mal auch bei 1 : 10.

3 mit Rindertuberkulose und 3 mit anderen säurefesten Bacillen geimpfte, anscheinend nicht schwer kranke Meerschweinchen zeigten keine Agglutination.

Bei 2 leicht tuberkulösen Kaninchen war die Reaktion 1mal positiv, 1mal negativ.

---

1) Das Blut derselben wurde uns von Herrn Dr. Parlato aus der Lungenheilstätte Wald gütigst zugesandt.

D. 13 mit Neutuberkulin (Bacillenemulsion) resp. direkt mit zerriebenen Bacillen behandelte Meerschweinchen, die über 1—2 mg Bacillensubstanz erhalten hatten, reagierten, ob sie außerdem tuberkulös waren oder nicht, sämtlich positiv, 3 mit Dosen unter 1 mg geimpfte dagegen negativ. — Unter 4 ebenso behandelten Kaninchen reagierten 2 positiv, 1 negativ, 1 unsicher.

Ein hochwertiges Serum, das wir der Güte des Herrn Geheimrat Prof. Koch verdanken, agglutinierte im Verhältnis von 1 : 250. — Nach 3 Monaten war es noch wirksam.

Mit einigen serösen Exsudaten von Menschen und Tieren, die zum Teil tuberkulös waren, konnte im Verhältnis von 1 : 5 keine sichere Agglutination erzielt werden. Feine Fibringerinnsel machten die Beurteilung der Reaktion schwierig.

Mit einer homogenen Kultur von Arloing und Courmont, die uns die französischen Forscher gütigst übersandten, wurden einige Reaktionen gemacht. Die Agglutination läßt sich hier unter dem Mikroskop verfolgen, doch scheint es sicherer zu sein, sich an das makroskopische Aussehen zu halten, da auch in der bloßen Kontrollflüssigkeit geringe Häufchenbildung auftritt. Wären nicht die oben erwähnten Nachteile der mühsamen Herstellung und des ungleichen Wertes verschiedener Kulturen, so wäre diese Agglutinationsflüssigkeit sehr empfehlenswert, weil die Reaktion leicht zu beurteilen scheint und weil sie schon innerhalb einiger Stunden auftritt.

Die Lyoner Kultur wurde von dem beigegebenen Kontrollserum, sowie von dem hochwertigen Serum von Berlin prompt agglutiniert. Das Serum von 6 Phthisikern, von denen 3 die Koch'sche Flüssigkeit agglutinierten, wurde auch nach dieser Methode geprüft, nur 1 Fall, der auch nach Koch positiv war, agglutinierte.

Negativ reagierten mehrere mit Bacillenemulsion behandelte Meerschweinchen, die die Koch'sche Flüssigkeit zum Teil stark agglutinierten. Dieses verschiedene Verhalten wurde auch von Rumpf und Guignard (4) bei mit Neutuberkulin behandelten Phthisikern konstatiert.

Für die Beurteilung des diagnostischen Wertes der Agglutination sind die angeführten Zahlen zu klein. Jedenfalls hat uns die Reaktion bei leichten und bei schweren Fällen von Tuberkulose versagt. Die Frage ist von den verschiedensten Seiten studiert worden, zu einer Klärung ist es aber noch nicht gekommen [1]). Während Arloing und Courmont (1) in der Agglutination eine spezifische Reaktion von hohem diagnostischen Werte, besonders für die Frühdiagnose, sehen und andere französische Forscher der gleichen Ansicht sind, so ist in Deutschland nur Bendix (6) auf Grund mikroskopischer Untersuchung zum gleichen Resultat gekommen; viele andere Autoren aber [C. Fraenkel (7), Beck und Rabinowitsch (8), R. Koch (2), Romberg (3), Garcia (9) u. A.] haben gefunden, daß die Reaktion nicht spezifisch sei, indem sie sowohl bei Fällen von Tuberkulose versage, als auch bei Individuen, die klinisch keine Symptome von Tuberkulose aufweisen, positiv sei. Eine praktisch verwertbare Serumdiagnose der Tuberkulose, und besonders der beginnenden Tuberkulose, giebt es noch nicht.

1) Der Vollständigkeit halber sei erwähnt, daß Ferrán (5) schon im Jahre 1897 angab, Kulturen von Tuberkelbacillen in gewöhnlicher Bouillon gezüchtet und durch das Serum eines tuberkulösen Tieres agglutiniert zu haben.

II. Behandlung mit Neutuberkulin (Bacillenemulsion).

Koch ging bei der therapeutischen Anwendung der zerriebenen Bacillen von der Ansicht aus, die Entwickelung der natürlichen wie diejenige der künstlich erzeugten agglutinierenden Fähigkeit des Blutserums gehe parallel mit der Bildung von Schutzkörpern, mit einer gewissen Immunisierung. Er hatte, in Uebereinstimmung mit Arloing und Courmont, die Reaktion häufiger bei leichten als bei schweren Phthisen auftreten sehen. — Andererseits haben Beck und Rabinowitsch (8) und Garcia (9) gefunden, daß schwere Tuberkulosen ebenso leicht agglutinieren, als leichte. Die oben angeführten eigenen Resultate scheinen auch dafür zu sprechen. Rumpf und Guignard (4) beobachteten das Gleiche, erklären freilich die bei ihren schweren Fällen auftretende Agglutination als günstige Beeinflussung der Krankheit durch die Heilstättenbehandlung.

Die Beziehungen zwischen Agglutination und Immunität sind für andere Infektionskrankheiten (unter anderem Typhus) experimentell geprüft worden. Während einige Autoren (u. a. Gruber) einen Parallelismus zwischen agglutinierenden Eigenschaften und baktericider Wirkung des Blutserums fanden, kamen andere zu dem Ergebnisse, daß zwar Beziehungen zwischen genannten Eigenschaften bestehen, aber keine Proportionalität. So fand Deutsch (10), daß beim Typhus bei hohem Agglutinationswerte gewöhnlich auch eine starke Immunität bestehe, aber nicht umgekehrt. Andererseits führt er eine Mitteilung von Fraenkel und Otto an, nach der ein mit Typhuskulturen gefütterter Hund starke Agglutination zeigte, aber wenig Immunität. Die Antikörper bilden sich in den lymphatischen Organen; die Agglutinine dagegen im Blute. — Zu ähnlichen Ergebnissen kam Castellani (11).

Die Intensität der Widal'schen Typhusreaktion giebt bekanntlich keinen Fingerzeig für die Prognose; kann doch das Phänomen im Leichenblute stark ausgesprochen sein.

Im Körper, bei seinem Kampfe gegen die Bakterien, spielt jedenfalls die Agglutination keine Rolle. Das Pfeiffer'sche Phänomen ist nicht von Agglutination begleitet. Und wenn man, wie dies Taurelli Salimbeni (12) gethan hat, einem choleraimmunen Pferde lebende Vibrionen subkutan einimpft, so findet man in dem subkutanen Exsudat, zu verschiedenen Zeiten entnommen und sofort untersucht, keine Spur von Agglutination; diese beginnt aber rasch nach der Erfernung des Serums aus dem Körper.

In nachfolgenden Experimenten wurde ebenfalls versucht, bei Anwendung des Neutuberkulins Beziehungen zwischen Agglutination und Immunität zu finden.

Die Tierversuche wurden nach folgendem Plane ausgeführt:

1. Serie: Infektion mit virulenten Tuberkelbacillen, dann Behandlung mit Bacillenemulsion. — Tuberkulöse Kontrolltiere.

2. Serie: Vorbehandlung mit Neutuberkulin, dann Infektion mit virulenten Tuberkelbacillen. Bei einem Teile der Tiere Fortsetzung der Behandlung nach der Infektion. — Tuberkulöse Kontrolltiere.

3. Serie: Nur Behandlung mit Tuberkulin, zur Beobachtung von dessen Wirkung auf gesunde Tiere.

Das Neutuberkulin „Bacillenemulsion“, das zu den Experi-

menten gebraucht wurde, wurde teils von Höchst bezogen, teils nach Koch's Vorschrift aus den Höchster zerriebenen Bacillen hergestellt. Dazu werden die Bacillen mit der 100-fachen Menge destillierten Wassers aufgeschwemmt und dann noch die gleiche Menge Glycerin zugesetzt. Man erhält so eine dickliche, gleichmäßig graulich getrübte Flüssigkeit. Diese wird einige Tage stehen gelassen und dann von dem sich bildenden Bodensatze abgegossen, worauf sie zum Gebrauche fertig ist. Nach längerem Stehen bildet sich in ihr wieder ein leichter Bodensatz. Soll die Flüssigkeit zu intravenösen Injektionen gebraucht werden, so wird sie durch Centrifugieren möglichst von allen festen Partikelchen befreit. Mikroskopisch fand ich im Tuberkulin wenig körnigen Detritus, keine säurefesten Bestandteile.

Die Verdünnungen der Emulsion wurden hergestellt mit der Karbolkochsalzlösung. Die Behandlung wurde im allgemeinen begonnen mit der von Koch für den Menschen angegebenen Anfangsdosis, d. h. mit 0,0025 mg fester Substanz. Die Injektionen wurden im Anfange etwa 3mal wöchentlich gemacht und jedesmal mit der Dosis um das 2—5-fache gestiegen. Beim Auftreten von Reaktionen wurde länger pausiert, aber mit der Dosis weiter gestiegen; die größten Dosen (4—10 mg) wurden in mindestens 14-tägigen Pausen gegeben.

Zu Versuchstieren dienten hauptsächlich Meerschweinchen, sowie einige Kaninchen. Letztere, um auch ein für Tuberkulose weniger empfängliches Tier zu haben, an dem sich eventuell eine Heilung erzielen ließe.

Die Tuberkulininjektionen wurden bei den Meerschweinchen stets unter die Bauchhaut gemacht; bei den Kaninchen teils subkutan, teils in die Ohrvenen.

Zur Infektion wurden verwendet Reinkulturen von menschlicher Tuberkulose, und zwar eine Kultur des Institutes, durch Tierpassage isoliert aus einem Falle von Hauttuberkulose (Wange), und eine Kultur, die uns Herr Geheimrat Prof. Koch gütigst übersandt hat. — Es wurde jeweilen ein Teil der Kulturen mit steriler Bouillon zerrieben und den Tieren einer Versuchsgruppe gleiche Mengen injiziert. Die Meerschweinchen wurden teils intraperitoneal, teils subkutan geimpft; die Kaninchen mit einer centrifugierten Aufschwemmung intravenös. Auch für einen Teil der Meerschweinchen wurde die Aufschwemmung vor der Injektion centrifugiert. Die mikroskopische Untersuchung ergab, daß sich in der centrifugierten Flüssigkeit zahlreiche vereinzelte und in kleinen Gruppen vereinigte Bacillen befanden.

Die Kultur des Zürcher Institutes erwies sich als äußerst virulent. Die intraperitoneal damit geimpften Meerschweinchen starben so schnell, daß eine längere Tuberkulinbehandlung unmöglich war. Diese war nur bei den subkutan geimpften Tieren möglich. Bei diesen Tieren entwickelte sich stets an der Infektionsstelle ein Absceß, der aufbrach resp. von dem Tiere aufgebissen wurde. Das entstehende Ulcus zeigte wenig Tendenz zur Heilung.

1. Serie.
Infektion mit virulenten Tuberkelbacillen, dann Behandlung mit Neutuberkulin.

Auf diese Weise wurden behandelt 6 Meerschweinchen und 1 Kaninchen mit ebensovielen Kontrolltieren.

Bei 2 von den 6 Meerschweinchen, je 1 intraperitoneal und 1 subkutan geimpften, begann die Behandlung 17 Tage nach der Infektion, bei 2 weiteren 4 Tage und bei den 2 letzten (beide subkutan geimpft), sowie bei dem Kaninchen 1 Tag nach der Infektion.

Die ersten Tuberkulininjektionen riefen bei den mit Tuberkelbacillen infizierten Meerschweinchen keine besonderen Symptome hervor. Wenn aber eine gewisse Dosis erreicht war, die bei den einzelnen Tieren 0,005—1,2 mg betrug, trat eine typische fieberhafte Reaktion hervor; die Körpertemperatur, in recto gemessen, stieg um 1—2° C. Die Temperatur des Meerschweinchens ist zwar variabel, ich fand bei gesunden Tieren Werte zwischen 37,2 und 39°, bei tuberkulösen bis 40°; aber innerhalb einiger Stunden variierte die Temperatur gewöhnlich doch nur um einige Zehntelgrade, so daß ein Unterschied von 1° C als abnorm bezeichnet werden kann. Beispiele finden sich in nachstehenden Tabellen. Das Maximum der Temperatursteigerung durch das Tuberkulin war etwa 3 Stunden nach der Injektion erreicht. Bei starker Reaktion verlor das Tier in den nächstfolgenden 2 Tagen etwas an Körpergewicht.

Einmal konnte ich eine lokale Reaktion beobachten. Die Ränder eines tuberkulösen Ulcus röteten sich und schwollen an.

Die kleinen Tuberkulindosen, bei denen die Emulsion stark verdünnt war, riefen keine örtliche Reizung an der Injektionsstelle hervor, wohl aber die großen, wo wenig verdünntes oder gar reines Tuberkulin zur Anwendung kam. Es konnte eben bei Meerschweinchen nicht stark verdünnt werden, weil sonst die Gesamtmenge zu groß geworden wäre. Es kam zu Rötung und ödematöser Schwellung der betreffenden Stelle, und die Resorption war in diesen Fällen sehr verzögert. Die fieberhafte Reaktion trat dennoch ebenso schnell auf, zog sich aber länger hin. — Einige Male kam es sogar zur Nekrose der Haut, es bildete sich ein trockener Schorf. Dieser fiel nach einiger Zeit ab und hinterließ ein flaches Ulcus, das glatte Ränder hatte, wenig secernierte und meist rasch heilte. (Diese Nekrose kam auch bei nicht tuberkulösen, mit großen Dosen behandelten Tieren zustande.) Ein Teil dieser Reizwirkung ist wohl dem Glycerin zuzuschreiben, das ja im Tuberkulin zu 50 Proz. enthalten ist.

Waren die Meerschweinchen hochgradig tuberkulös, so wurden sie von der Injektion größerer Dosen Tuberkulin stark mitgenommen, auch wenn sie die vorhergehende Injektion noch gut ertragen hatten und mit der Dosis nicht mehr oder nur noch wenig gestiegen wurde. Die Temperaturreaktion war zwar manchmal geringer als bei kräftigen Tieren, dagegen erfolgte ein merklicher Gewichtsverlust; die Tiere waren 1 bis 2 Tage lang matt und fraßen wenig. Einige Tiere starben am Tage nach einer Injektion.

Was nun die durch die Injektionen erzielte agglutinierende Fähigkeit des Blutserums betrifft, so konnten die beiden intraperitoneal geimpften Tiere (No. 9 und No. 15 der nachfolgenden Tabelle) nicht so lange behandelt werden, bis die Agglutination auftrat, da sie schon starben, als erst die Dosen von 0,005 resp. 0,15 mg Trockensubstanz erreicht war. Die Kontrolltiere der beiden dagegen agglutinierten, das eine bei 1 : 5, das andere bei 1 : 10. Auch eines der 4 subkutan geimpften (No. 19) starb schnell, nachdem es bis 1 mg erhalten hatte (es war mit größeren Tieren im Stalle zusammen und so vielleicht beim Fressen benachteiligt). Nach dem Tode konnte nur wenig Blut entnommen werden, so daß die Reaktion nur bei 1 : 10 ausgeführt werden konnte; sie war

negativ. Die 3 übrigen subkutan geimpften Tiere dagegen agglutinierten, das eine (No. 17), nachdem es 2 mg erhalten hatte, bei 1 : 5, das zweite (No. 20) nach 8 mg bei 1 : 10, und das dritte (No. 11) bei 1 : 50 nach einer Dosis von 4 mg.

Die Proben wurden jeweilen etwa eine Woche nach der Injektion einer größeren Dosis gemacht. Die agglutinierende Fähigkeit erreicht um diese Zeit nach Koch ihr Maximum. — 6 Wochen nach Aufhören der Behandlung, die nicht bei allen Tieren bis zum Tode fortgesetzt wurde, zeigte sich bei dem noch lebenden Meerschweinchen No. 20 die agglutinierende Eigenschaft nicht mehr. — Von den 4 subkutan geimpften Kontrolltieren agglutinierte nur eines bei 1 : 5.

Meerschweinchen No. 9.
Mit Zürcher Kultur intraperitoneal infiziert.

Datum	Gewicht	Dosen Tuberkulin (Trockensubstanz)	Temperaturen	Agglutination
24. XII.	245 g	Infektion		
10. I.	245 „	0,0025 mg		—
13. I.	225 „		39,3—39,3°	
14. I.	230 „	0,005 „	39,2—39,7°	
15. I.	260 „		38,7—38,9°	
21. I.	200 „	†		—

Lebensdauer nach der Infektion: 28 Tage.

Sektionsprotokoll: Inguinale, retroperitoneale und retrosternale Lymphdrüsen vergrößert, nicht verkäst. Omentum, Milz und Leber tuberkelhaltig; wenig Verkäsung. Pleurales Exsudat. Beide Lungen hepatisiert; keine deutlichen Tuberkel. — Mikroskopisch Bacillen im Omentum. Pleuraexsudat steril.

Das gleichzeitig infizierte Kontrolltier (No. 10), Gewicht 265 g, starb nach 25 Tagen, 270 g; Agglutination positiv bei 1 : 10.

Sektionsprotokoll: Subkutanes Oedem. Inguinale und retrosternale Drüsen vergrößert, nicht verkäst. Peritoneales Exsudat. Omentum verdickt und verkäst, Milz groß, Leber und Thoraxorgane normal. Bacillen mikroskopisch nachgewiesen.

Meerschweinchen No. 11.
Mit Zürcher Kultur subkutan geimpft.

Datum	Gewicht	Dosen	Temperaturen	Agglutination
24. XII.	270 g	Infektion		
10. I.	280 „	0,0025 mg		—
13. I.	270 „		39,8—39,8°	
14. I.	260 „	0,005 „	39,2—40,6°	
15. I.	285 „		39,3—39,3°	
16. I.	280 „	0,01 „		
18. I.		0,02 „		
20. I.	280 „	0,05 „		
22. I.	280 „	0,1 „		
24. I.	265 „	0,2 „		
27. I.		0,4 „		
30. I.	270 „	1 „	39,2—40,5°	
31. I.	260 „		40,1°	
5. II.	260 „	2 „	39,2—40,2°	
6. II.	250 „		39,4°	
11. II.	280 „	4 „	39,6—41,1°	
12. II.			40,2°	
20. II.	285 „	8 „	39,6—39,9°	+ 1:50
21. II.		†		?

Lebensdauer: 59 Tage.

Sektionsprotokoll: Impfstelle vernarbt, in der Narbe einige Käsepunkte, Verwachsungen der Bauchhaut mit der Fascie infolge der Injektionen. Inguinale, retroperitoneale, retrosternale, tracheale Drüsen vergrößert und verkäst, bacillenhaltig. Omentum normal. Milz stark vergrößert, Leber weniger. In den Lungen zerstreute miliare Tuberkel. Blut flüssig, kein klares Serum erhältlich.

Das Kontrolltier, No. 12, gleichzeitig infiziert, 260 g, starb nach 41 Tagen. 240 g, Agglutination negativ.

Sektionsprotokoll: Tiefes Ulcus an der Infektionsstelle; im Grunde derselben gangränöser Darmvorfall (Todesursache). Inguinale, axillare, retroperitoneale, retrosternale Drüsen vergrößert und verkäst, bacillenhaltig. Omentum kaum verdickt. Milz stark vergrößert, mit nekrotischen Herden; miliare Tuberkel in der vergrößerten Leber und den Lungen.

Meerschweinchen No. 15.
Mit Zürcher Kultur intraperitoneal geimpft.

Datum	Gewicht	Dosen	Temperaturen	Agglutination
9. I.	280 g	Infektion		
13. I.	270 „	0,0025 mg	39,1—39,8°	—
15. I.	260 „	0,005 „	40,1—40,1°	
17. I.	270 „	0,01 „	40,2—40,8°	
20. I.	270 „	0,025 „		
21. I.	245 „		39,6°	
22. I.	240 „	0,075 „		
24. I.	245 „	0,15 „		
27. I.	215 „	†		—

Lebensdauer: 16 Tage.

Sektionsprotokoll: Inguinale, retroperitoneale, retrosternale, tracheobronchiale Drüsen mäßig vergrößert, wenig verkäst. Omentum stark verdickt, nicht verkäst, bacillenhaltig. Am Peritoneum parietale Tuberkel. Milz stark vergrößert; Lungen normal.

Kontrolltier No. 16, 290 g, starb nach 32 Tagen, 245 g, Agglutination positiv bei 1:5.

Sektionsprotokoll: Absceß in den Bauchdecken. Sämtliche Drüsen mäßig vergrößert, verkäst. Omentum an der Bauchwand adhärent, verdickt, käsige Punkte, Bacillen nachgewiesen. Milz stark vergrößert; Adhäsionen, nekrotische Herde. Vereinzelte Tuberkel in der Leber, zahlreiche in den Lungen.

Meerschweinchen No. 17.
Mit Zürcher Kultur subkutan geimpft.

Datum	Gewicht	Dosen	Temperaturen	Agglutination
9. I.	235 g	Infektion		
13. I.	240 „	0,0025 mg	38,7—39,3°	
15. I.	245 „	0,005 „	38,8—39,9°	
17. I.	250 „	0,01 „	40,1—40,3°	
20. I.	245 „	0,025 „	40,2—40,1°	
22. I.	255 „	0,075 „		
24. I.	255 „	0,15 „		
27. I.		0,3 „		
30. I.		1 „	40,3—41,9°	
31. I.	235 „		40,7°	
6. II.	260 „	2 „	40,0—41,6°	
14. II.	240 „	4 „	40,2—42,1°	
4. III.		2 „		—
7. III.	220 „	†		+ {1:5, 1:10?

Lebensdauer: 57 Tage.

Sektionsprotokoll: Ulcus an der Infektionsstelle. An der Stelle der letzten Tuberkulininjektion eine sulzig-hämorrhagische Infiltration. Sämtliche Lymphdrüsen vergrößert und verkäst. Milz sehr stark vergrößert (Gewicht 10 g), dunkel; viele große nekro-

tische Herde. Omentum ganz wenig verdickt. Leber groß, blaß, wenige Tuberkel. Nieren blaß. In den Lungen zahlreiche zum Teil größere und verkäste, bacillenhaltige Tuberkel.

Kontrolltier, No. 18, 290 g, starb nach 33 Tagen, 260 g, Agglutination positiv bei 1:5.

Sektionsprotokoll: Ulcus an der Infektionsstelle. Inguinale, retroperitoneale, retrosternale Drüsen mäßig vergrößert, wenig verkäst. Omentum an der infiltrierten Bauchwand adhärent und in diesem Teile verdickt, bacillenhaltig. Milz groß, mit Adhäsionen. Miliartuberkulose der Lungen.

Meerschweinchen No. 19 und 20.
Mit Berliner Kultur subkutan geimpft.

	No. 19				No. 20			
Datum	Gewicht	Dosen	Temperatur.	Agglut.	Gewicht	Dosen	Temperatur.	Agglut.
22. I.	205 g	Infektion			220 g	Infektion		
23. I.		0,0025 mg	38,9—39,2°			0,0025 mg	38,8—40,1°	
25. I.	195 „	0,005 „			220 „	0,005 „		
27. I.	200 „	0,05 „	39,2—39,0°		225 „	0,05 „	38,0—39,0°	
29. I.		0,2 „				0,2 „		
31. I.	215 „	0,3 „	38,7—40,7°		235 „	0,3 „	39,3—40,1°	
3. II.	205 „		40,1°		235 „	0,6 „	39,0—39,9°	
5. II.			40,8—40,0°			1,2 „	39,8—40,9°	
6. II.	210 „	1 „	39,6—41,0°					
10. II.		†		— 1:10	255 „	2,3 „	39,6—41,0°	
20. II.					265 „	5 „	39,7—41,1°	+ 1:5
5. III.					290 „	8 „	39,7—40,4°	
13. III.					290 „			+ 1:10
26. IV.					280 „			—
5. V.					260 „	†		

Lebensdauer: No. 19 19 Tage, No. 20 103 Tage.

Sektionsprotokoll von No. 19: Haut an der Infektionsstelle infiltriert, an den Stellen der Tuberkulininjektionen adhärent. Alle Lymphdrüsenarten mäßig vergrößert, nicht verkäst. Omentum und Leber normal, Milz mäßig vergrößert. Lungen normal. Bacillen mikroskopisch nachgewiesen.

Sektionsprotokoll von No. 20: Ulcus an der Infektionsstelle; am Bauche ferner ein subkutaner Käseherd. Drüsen an allen charakteristischen Stellen vergrößert und nekrotisch (kein flüssiger Eiter). Omentum frei. Milz groß; zum allergrößten Teil aus gelbem nekrotischen Gewebe bestehend. In der Leber nekrotische Herde. Nieren blaß. In den Lungen Tuberkel, bacillenhaltig.

Kontrolltiere No. 21 und 22.

No. 21, 215 g, gestorben nach 85 Tagen, 300 g, Agglutination negativ.

Sektionsprotokoll: Lymphdrüsen überall vergrößert und verkäst, bacillenhaltig. Omentum frei. Milz kolossal vergrößert (13 g), mit kleinen Tuberkeln. Tuberkel in der Leber und den Lungen. Nieren sehr blaß.

No. 22, 195 g, gestorben nach 19 Tagen, 215 g, Agglutination negativ.

Sektionsprotokoll: An der Infektionsstelle Infiltrat, nicht verkäst, bacillenhaltig. Lymphdrüsen überall etwas vergrößert, eine axillare verkäst. Omentum normal. Milz kaum vergrößert. Lungen normal.

Vorstehende Tabellen bieten eine tabellarische Uebersicht über Körpergewicht, Tuberkulindosen, Temperaturen und Agglutination bei den einzelnen Tieren. Die beiden Zahlen in der Temperaturkolonne bedeuten die Temperaturen zu verschiedenen Tageszeiten; an einem Injektionstage bedeuten sie die Temperatur vor der Injektion und 3 Stunden nach derselben.

Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe sind folgende: Die Lebensdauer nach der Infektion betrug bei den beiden intraperitoneal geimpften und behandelten Tieren 28 und 16 Tage, bei den Kontrolltieren 25 und 32 Tage. Die 4 subkutan geimpften Tiere lebten durchschnittlich 59,5, die Kontrolltiere 44,5 Tage. Die Höhe des agglutinierenden Vermögens des Blutserums war ohne Beziehung zu der

Schwere des Falles. Bei dem am längsten lebenden Tiere No. 20 konnte die Agglutination nur im Verhältnis von 1 : 10 erreicht werden; das schwer tuberkulöse Tier No. 11 dagegen reagierte kurz vor dem Tode bei 1 : 50.

Bei der Autopsie ließen sich keine Unterschiede zwischen behandelten und nicht behandelten Tieren konstatieren; bei beiden fand sich schwere allgemeine Tuberkulose mit den gleichen Veränderungen. Vernarbungsvorgänge waren nicht zu sehen. Auch die bei einigen Tieren vorgenommene histologische Untersuchung einiger Organe ergab keine ins Auge fallenden Unterschiede. Mit Hämalaun-eosin gefärbte Schnitte zeigten bei behandelten wie bei Kontrolltieren ungefähr den gleichen Bau der Tuberkel. Reichlichere Bindegewebsentwickelung bei den behandelten Tieren wurde nicht beobachtet. Nach Ziehl-Neelsen gefärbte Schnitte zeigten ungefähr die gleiche Bacillenzahl.

Kaninchen d, 2000 g

wurde mit Berliner Kultur intravenös geimpft und dann mit Bacillenemulsion behandelt. Es ertrug die subkutanen Tuberkulininjektionen sehr gut, zeigte bei 4 mg Temperaturreaktion und agglutinierte nach einer Woche bei 1 : 10, Gewicht 2100 g. Es bekam nun 1 mg sorgfältig centrifugiertes und verdünntes Tuberkulin intravenös. Die Temperaturreaktion war nicht typisch (0,7 ° C). Das Tier schien 10 Stunden nach der Injektion gesund. Am nächsten Morgen wurde es tot gefunden.

Sektionsprotokoll: Am Ohr nichts Besonderes. An der Stelle der letzten subkutanen Injektion (von 4 mg) eine kleinhaselnußgroße, schwartige, gelbliche Infiltration (keine Bacillen nachweisbar) mit hämorrhagischem Rande. Inguinal- und Axillardrüsen etwas vergrößert, nicht verkäst, dunkelbraunrot. Milz kaum vergrößert, Leber etwas blaß. Nieren hyperämisch, auf der Oberfläche einige submiliare Tuberkel (Bacillen enthaltend). In den Lungen zerstreute miliare Tuberkel; kein embolischer Infarkt. Blut lackfarben, klebrig, kein klares Serum erhältlich. Herzblut und Milzsaft steril. Todesursache nicht eruierbar.

2 Kaninchen der folgenden Serie ertrugen 2 mg Tuberkulin intravenös sehr gut; doch bei diesen war die intravenöse Behandlung mit 0,5 mg begonnen worden und die Tiere waren noch nicht tuberkulös.

Das Kontrolltier, Kaninchen e, 1700 g, agglutinierte 4 Wochen nach der Infektion bei 1 : 5; später nicht mehr. Nach 3 Monaten wurde das Tier, das keine krankhaften Symptome zeigte, getötet; Gewicht 2580 g.

Sektionsprotokoll: In der Leber einige kleine Coccidienherde. Nieren normal. Lungen makroskopisch ohne Tuberkel. Eine Trachealdrüse etwas vergrößert, mit schleimigem Inhalte. Keine Bacillen nachweisbar.

2. Serie.

Tiere mit Tuberkulin vorbehandelt und nachträglich mit virulenten Tuberkelbacillen infiziert.

Diese Tiere dienten (mit denen der 3. Serie) auch zum Studium der Wirkung der Bacillenemulsion auf gesunde Tiere. Verwendet wurden 6 Meerschweinchen und 3 Kaninchen, mit Kontrolltieren.

Die Injektionen von Neutuberkulin wurden in gleicher Weise vorgenommen wie bei den Tieren der 1. Serie, d. h. mit steigenden Dosen, und es wurden auch bei den kleinen Dosen kurze, bei den größeren längere Intervalle gemacht.

Die Behandlung wurde gut ertragen. Fieberhafte Reaktion trat bei nicht tuberkulösen Tieren nicht auf; wurde dagegen während der Behandlung das Tier mit virulenten Tuberkelbacillen geimpft und mit den Dosen weiter gestiegen, so trat bald die typische Reaktion auf. (Vergl. unten Meerschweinchen No. 4 und 7.)

Lokal traten dieselben Reizerscheinungen (bis zur Nekrose) auf wie bei tuberkulösen Tieren. Nach großen Dosen trat hie und da ein vor-

übergehender Gewichtsverlust auf; sonst aber nahmen die Tiere an Gewicht zu, wenn auch eher etwas langsamer als gewöhnlich gesunde Tiere.

Die Infektion mit virulenten Tuberkelbacillen erfolgte in verschiedenen Stadien der Tuberkulinbehandlung, teils wenn erst kleine, teils wenn große Dosen erreicht waren; bei Tieren, die schon agglutinierten, wie bei solchen, die es nicht thaten.

A. Meerschweinchen. Bei 2 Tieren (No. 4 u. 7) wurde die Infektion mit Tuberkelbacillen gemacht, bevor sie 1 mg bekommen hatten. Eines agglutinierte schon, das andere noch nicht. Beim Steigern der Dosen trat dann fieberhafte Reaktion auf, und es ließen sich bei diesen Tieren die höchsten Agglutinationswerte erreichen (1 : 20 und 1 : 40). Die 4 anderen Meerschweinchen wurden erst infiziert, nachdem sie mehrere Milligramme erhalten hatten und alle agglutinierten. Hier trat keine Fieberreaktion nach den großen Dosen auf, wie bei den schon tuberkulösen Tieren. 1 der Tiere agglutinierte bei 1 : 20, 1 bei 1 : 10, 2 nur bei 1 : 5. Die fieberhafte Reaktion scheint die Agglutininbildung zu begünstigen.

Meerschweinchen No. 4 und No. 7.
Mit Berliner Kultur subkutan geimpft.

	No. 4				No. 7			
Datum	Gewicht	Dosen	Temperatur.	Agglut.	Gewicht	Dosen	Temperatur.	Agglut.
18. XII.	280 g	0,025 mg	37,6—38,2°	—				
20. XII.					380 g	0,005 mg		—
23. XII.	280 „	0,05 „			375 „	0,02 „		
8. I.	310 „	0,1 „		—	365 „	0,05 „		—
10. I.	310 „	0,2 „			385 „	0,1 „		
13. I.	345 „	0,4 „			385 „	0,2 „		
17. I.	360 „	0,8 „			380 „	0,4 „		
20. I.	330 „			+ 1:10	370 „			—
22. I.	350 „	Infektion			395 „	Infektion		
23. I.		1,2 mg	39,1—39,6°			0,6 mg	39,1—39,7°	
25. I.	355 „	1,4 „				0,8 „		
27. I.	380 „	3 „				2 „		
30. I.		6 „	39,0—40,2°		415 „	4 „	38,5—39,9°	
31. I.	355 „		40,5°					
5. II.	355 „			+ 1:20	395 „	8 „	39,2—41,1°	
6. II.					350 „		40,3°	
11. II.	370 „	11,5 „	39,4—40,8°					
18. II.					415 „			+ 1:20
20. II.	365 „					11 „	39,8—41,2°	
5. III.	380 „	10 „		+ 1:40				
10. III.	365 „				440 „			+ 1:20
13. III.					440 „	10 „		
14. III.						†		
20. IV.	335 „	†		+ 1:5?				

Lebensdauer nach der Infektion: No. 4 88 Tage, No. 7 51 Tage.

Sektionsprotokoll von No. 4: Ulcus an der Infektionsstelle. Narben von den Tuberkulinnekrosen. Lymphdrüsen überall vergrößert, zum Teil verkäst, bacillenhaltig. Im Omentum ein kleines Knötchen, nicht verkäst. Milz sehr stark vergrößert; zahlreiche kleine nekrotische Herde. Leber blaß, vereinzelte Knötchen. Nieren groß, blaß. Lungen groß, sehr viele, zum Teil konfluierende Tuberkel.

Sektionsprotokoll von No. 7: Ulcus an der Infektionsstelle. Drüsen überall vergrößert und verkäst. Omentum kaum verdickt, nicht verkäst. Milz stark vergrößert; zahlreiche größere und kleinere Tuberkel. Leber blaß, wenige Tuberkel. Vor der Trachea ein großes Paket verkäster Drüsen; Bacillen mikroskopisch nachgewiesen.

Die beiden behandelten Tiere haben 88 resp. 51 Tage nach der Infektion gelebt, die Kontrolltiere, die kleiner waren (No. 21 u. 22 der 1. Serie) 85 resp. 19 Tage.

Die folgenden 8 Meerschweinchen wurden mit einer ziemlich starken Dosis der virulenten Zürcher Kultur geimpft, so daß besonders die intraperitoneal geimpften an akuter Tuberkulose zu Grunde gingen.

Meerschweinchen No. 1 und No. 8.
Intraperitoneal infiziert.

	No. 1				No. 8			
Datum	Gewicht	Dosen	Temperatur.	Agglut.	Gewicht	Dosen	Temperatur.	Agglut.
18. XII.	270 g	0,0025 mg	38,7—39,3°	—				
23. XII.	280 „	0,01 „						
8. I.	280 „	0,025 „		—	295 g	0,005 mg		—
10. I.	300 „	0,05 „			305 „	0,015 „		
13. I.	335 „	0,1 „			300 „	0,05 „		
17. I.	345 „	0,2 „			320 „	0,1 „		
22. I.	340 „	0,8 „		—				
23. I.					310 „	0,2 „	39,0—38,7°	
24. I.	325 „	1,2 „				0,6 „		
30. I.		1,5 „			325 „	1 „		
1. II.	345 „	3 „						
3. II.					305 „	4 „	38,8—39,3°	
5. II.	330 „	6 „	39,1—39,9°					
14. II.	365 „			+ 1:20	320 „	8 „		+ 1:5 1:10?
20. II.		Infektion				Infektion		
27. II.	390 „			+ 1:10	340 „	10 mg		
4. III.					320 „			+ 1:5 1:10?
17. III.	295 „	†						
7. IV.					285 „	†		

Lebensdauer nach der Infektion: No. 1 25 Tage, No. 8 46 Tage.

Sektionsprotokoll von No. 1: Inguinale, retroperitoneale, retrosternale Drüsen vergrößert, nicht verkäst. Bacillen nachgewiesen. Peritoneales Exsudat. Omentum verdickt, nicht verkäst. Milz stark vergrößert. In der Leber zahlreiche Tuberkel. Pleuraexsudat. In den Lungen kleinste Tuberkel.

Sektionsprotokoll von No. 8: Käsiger Bauchdeckenabsceß. Inguinale, retroperitoneale, retrosternale Drüsen vergrößert, nicht verkäst. Peritoneales Exsudat. Omentum verdickt. Milz vergrößert. Leber mit Tuberkeln bestreut. Nieren parenchymatös getrübt. Seröse Flüssigkeit in Pleuren und Pericard. Lungen atelektatisch.

Kontrolltier No. 27, 280 g, starb nach 19 Tagen, 295 g, Agglutination bei der Infektion positiv bei 1:5, beim Tode negativ.

Sektionsprotoll: Subkutanes Oedem. Peritonitis sero-fibrinosa. Drüsen überall vergrößert, zum Teil verkäst, bacillenhaltig, Omentum stark verdickt, von zum Teil verkästen Tuberkeln durchsetzt. Milz mäßig vergrößert. In Leber und Lungen einige miliare Tuberkel. Seröses Pleuraexsudat.

Kontrolltier No. 28, 225 g, starb nach 23 Tagen, 285 g, Agglutination positiv bei 1:5.

Sektionsprotokoll: Befund wie bei No. 27.

Meerschweinchen No. 2 und No. 3 wurden behandelt wie No. 1 und No. 8, aber subkutan infiziert.

No. 2, 280 g, behandelt mit Dosen bis 8 mg, agglutinierte bei 1:5; bei der Infektion Gewicht 400 g; Tod 67 Tage nachher, 335 g, Agglutination negativ.

Sektionsprotokoll: Ulcus an der Infektionsstelle. Drüsen überall vergrößert und verkäst, bacillenhaltig. Milz sehr stark vergrößert, nekrotische Herde. Ebenso Leber. Omentum normal. In den Lungen zahlreiche Tuberkel, zum Teil verkäst.

No. 3, 275 g, behandelt mit Dosen bis 6 mg, agglutinierte bei 1:10. Gewicht bei der Infektion 380 g. Nachher noch 1mal 10 mg Tuberkulin. Nach 14 Tagen Agglutination positiv bei 1:5. Tod 35 Tage nach der Infektion, 325 g.

Sektionsprotokoll: Drüsen überall vergrößert, wenig verkäst. Peritoneales Exsudat. Omentum an der Bauchwand adhärent, verdickt, stellenweise verkäst. Milz sehr stark vergrößert. Leber mit Tuberkeln besäet. In den Lungen keine deutlichen Tuberkel.

Kontrolltier No. 25, 250 g, nach 67 Tagen gestorben, 230 g, Agglutination negativ.

Sektionsprotokoll: Ulcus an der Infektionsstelle. Lymphdrüsen überall mäßig vergrößert und verkäst, bacillenhaltig. Omentum normal. Milz vergrößert, nekrotische Herde. Leber ebenso. In den Lungen zahlreiche Tuberkel, zum Teil verkäst.

Kontrolltier No. 26, 270 g, nach 63 Tagen gestorben, 260 g, Agglutination negativ.

Sektionsprotokoll: Befund ungefähr wie beim vorhergehenden. Omentum mit der Oberfläche der (zum großen Teil aus nekrotischem Gewebe bestehenden) Milz verwachsen, wenig verdickt und verkäst.

Zu der Gruppe dieser 8 Tiere ist zu bemerken, daß die Kontrolltiere kleiner als die behandelten waren. Die beiden intraperitoneal geimpften und behandelten Meerschweinchen lebten nach der Infektion 25 und 46 Tage, die Kontrolltiere 19 und 23 Tage. Von den subkutan geimpften Tieren haben die behandelten 67 und 35 Tage, die Kontrolltiere 67 und 63 Tage nach der Infektion gelebt. Bei der Autopsie fand sich kein namhafter Unterschied zwischen behandelten und Kontrolltieren.

B. Kaninchen. Es wurden 3 Kaninchen auf gleiche Weise behandelt wie die Meerschweinchen. Sie ertrugen die Tuberkulinbehandlung gut und zeigten keine krankhaften Symptome. An der Injektionsstelle von großen Dosen entwickelte sich zuweilen eine prall-elastische Infiltration (vergl. Sektionsprotokoll von Kaninchen d, 1. Serie), die sich allmählich wieder zurückbildete. Die ersten Injektionen wurden intravenös gemacht, die folgenden subkutan, da die Ohrvenen nach mehrmaligem Anstechen für die Injektionen sich nicht mehr eigneten. Gewichtsverluste durch die großen Dosen wurden nicht beobachtet. Die Infektion mit virulenten Tuberkelbacillen erfolgte erst nach der Behandlung mit großen Tuberkulindosen, und zwar intravenös mit je 2 ccm einer centrifugierten Aufschwemmung der Berliner Kultur, die mikroskopisch ziemlich zahlreiche, meist isolierte Bacillen zeigte.

Was die agglutinierende Fähigkeit des Blutserums betrifft, so konnte sie nach Injektion von 4 resp. 8 mg unter die Haut bei keinem der Tiere sicher beobachtet werden. (Die Beobachtung war erschwert dadurch, daß es nicht so leicht wie beim Meerschweinchen gelang, völlig klares Serum zu erhalten.) Es wurde nun bei 2 Tieren wieder zu intravenösen Injektionen übergegangen, von 0,5—2 mg. Nach Koch ist die intravenöse Injektion 10mal wirksamer als die subkutane. Es trat danach nur bei einem der Tiere vorübergehend eine sichere Agglutinationsfähigkeit des Serums bei 1:5 auf.

Die Tiere, sowie ein Kontrolltier waren 8 Wochen nach der Infektion scheinbar gesund und hatten beständig an Gewicht zugenommen. Sie wurden nun getötet.

Kaninchen a.

Gewicht 1450 g. Wurde intravenös geimpft mit 0,025—0,1 mg Neutuberkulin. Dann subkutan mit 0,2—4 mg. Agglutination negativ. Nun intravenöse Behandlung mit 0,5—2 mg. Agglutination positiv bei 1:5. Bei der Infektion Gewicht 2200 g. Nachher noch 10 mg Tuberkulin subkutan. Nach 2 Monaten Gewicht 2310 g, Tier getötet. Agglutination negativ.

Sektionsprotokoll: Ausgezeichneter Ernährungszustand. Keine deutlichen Drüsenschwellungen. An den Injektionsstellen der Bacillenemulsion keine Veränderungen. Milz nicht vergrößert. In der Leber kleine Coccidienherde. In Nieren und Lungen (Unterlappen) vereinzelte verkäste miliare Tuberkel. Mikroskopisch Tuberkelbacillen.

Kaninchen b.

Gewicht 1530 g. Behandlung wie bei Kaninchen a; aber nur subkutane Injektionen bis 10 mg. Agglutination negativ. Bei der Infektion Gewicht 1920 g. Nachher noch 10 mg subkutan. Nach 2 Monaten Gewicht 2080 g; Tier getötet; keine Agglutination.

Sektionsprotokoll: Befund wie bei Tier a, nur in der linken Niere ein größerer Tuberkel und im Unterlappen der rechten Lunge zwei größere käsige Herde. Bacillen nachgewiesen.

Kaninchen c.

Gewicht 1900 g. Behandlung wie bei Tier a. Bei der Infektion Gewicht 2300 g; Agglutination bei 1:5 zweifelhaft. Nach 2 Monaten getötet, 2400 g, Agglutination negativ.

Sektionsprotokoll: In den Lungen keine sicheren Tuberkel. Sonst Befund wie bei Tier a.

Kaninchen f, Kontrolltier.

1700 g. 3 Wochen nach der Infektion gestorben, 1300 g. Todesursache nicht mit Bestimmtheit eruierbar. Es bestand eine (spontane) Genitalaffektion, die kurz nach der Infektion bemerkt wurde. Bei der Autopsie makroskopisch keine Spur von Tuberkulose. In Schnittpräparaten der Lungen vereinzelte, nur mikroskopisch sichtbare, typische Tuberkel mit Bacillen.

Kaninchen g, Kontrolltier.

1880 g. 2 Monate nach der Infektion getötet, 2220 g, Agglutination negativ.

Sektionsbefund wie bei Tier a, nur Tuberkel kleiner und weniger zahlreich.

Diese Versuche zeigten aufs neue, daß die Disposition für Infektion durch einen bestimmten Stamm von Tuberkelbacillen bei Kaninchen und bei Meerschweinchen sehr verschieden sein kann. Die Kaninchen haben ungefähr das Doppelte einer Dosis, die Meerschweinchen sicher tötete, gut ertragen.

Ein Einfluß der Tuberkulinbehandlung auf die Entwickelung dieser leichten Tuberkulose ließ sich nicht feststellen. Sie hatte allerdings sehr wenig agglutinierende Eigenschaften hervorgebracht.

3. Serie.

Behandlung nur mit zerriebenen Bacillen oder Bacillenemulsion ohne nachherige Infektion mit virulenten Tuberkelbacillen.

Zu diesen Versuchen wurden nur Meerschweinchen verwendet.

Die unmittelbaren Wirkungen der Tuberkulineinspritzungen auf gesunde Tiere wurden bei den Tieren der 2. Serie beschrieben und waren auch bei den Tieren dieser Serie die gleichen. Agglutination wurde erzielt. Die folgenden Versuche dienten hauptsächlich dazu, eventuelle bleibende Wirkungen der Injektionen festzustellen.

Bei der mikroskopischen Untersuchung der „zerriebenen Tuberkelbacillen“ drängte sich die Frage auf, ob die in dem Präparate konstatierten Bacillen nicht zum Teil ihre Virulenz bewahrt hätten. Es wurden deshalb 2 Meerschweinchen zu verschiedenen Malen mit dem Höchster Präparat „Zerriebene Tuberkelbacillen“ geimpft, die beiden ersten Male intraperitoneal, dann subkutan. Die Injektionen des mit Karbolkochsalzlösung aufgeschwemmten Materiales wurden zunächst gut ertragen; Temperaturerhöhung trat nicht auf. Allmählich aber zeigten sich Infiltrationen der Haut an den Injektionsstellen, Nekrosen, Schwellung der Leistendrüsen, Gewichtsabnahme und schließlich trat der Tod ein.

Meerschweinchen No. 5 und No. 6.
Mit „zerriebenen Tuberkelbacillen“ behandelt.

	No. 5			No. 6		
Datum	Gewicht	Dosen	Agglutination	Gewicht	Dosen	Agglutination
18. XII.	265 g	2 mg	—	240 g	2 mg	—
20. XII.	255 „	2 „		240 „	2 „	
9. I.	285 „	2 „	—	270 „	2 „	—
15. I.	350 „	2 „		340 „	2 „	
17. I.		3 „			3 „	
24. I.	335 „		—	325 „		—
28. I.		5,5 „			5,5 „	
5. II.	315 „		+ 1:10	275 „		— ?
10. II.		†	+ 1:10		†	+ 1:5

Sektionsprotokoll von No. 5: Injektionsstellen narbig. In der Bauchwand ein kleiner käsiger Absceß mit ziemlich zahlreichen Bacillen. Leistendrüsen mäßig vergrößert, nicht verkäst; retroperitoneale und retrosternale Drüsen stark vergrößert, verkäst, mikroskopisch zahlreiche, lange Bacillen. Omentum verdickt, verkäst. Milz klein, etwas höckerig, aber ohne sichere Tuberkel. Leber und Lungen makroskopisch normal.

Sektionsprotokoll von No. 6: Schorf an der letzten Injektionsstelle. Absceß in den Bauchdecken. Inguinale, retroperitoneale, retrosternale Drüsen mäßig vergrößert, zum Teil verkäst; enthalten lange Bacillen; aber weniger zahlreich als bei No. 5. Milz klein, mit der Umgebung verwachsen. Uebrige Organe normal.

Es handelte sich also bei beiden Tieren um eine typische, noch nicht weit vorgeschrittene Tuberkulose. Bei den Injektionen war immer sehr sorgfältig vorgegangen worden; die nur aus Glas und Metall bestehende Spritze wurde allerdings auch zur Infektion mit virulenten Bacillen benutzt, aber sie wurde jedesmal vor und nach dem Gebrauch gründlich ausgekocht; ganz besonders natürlich, wenn sie für infektiöses Material benutzt worden war. Die Tiere waren nie mit tuberkulösen im gleichen Stalle gewesen.

Um noch zu entscheiden, ob am Ende die Affektion durch tote Bacillen bedingt sei — was allerdings wegen der großen Menge und der bedeutenden Länge der Bacillen sehr unwahrscheinlich war (in dem Präparate „zerriebene Bacillen“ waren die meisten Bacillen sehr kurz) — wurden folgende weitere Versuche gemacht:

Einmal wurden mit dem Eiter der retrosternalen Drüsen beider Tiere Serumröhrchen geimpft. Im Verlaufe von mehreren Wochen entwickelten sich trockene, schuppige Kulturen, die sich mikroskopisch als Reinkulturen von säure- und alkoholfesten Bacillen erwiesen. Sodann wurde mit dem gleichen Eiter von jedem Tiere ein weiteres Meerschweinchen intraperitoneal geimpft.

Meerschweinchen No. 23.

Mit Eiter von No. 5 geimpft. 245 g. Tod nach 78 Tagen. 305 g.

Sektionsprotokoll: Inguinale, axillare, retroperitoneale, retrosternale, bronchiale Drüsen vergrößert und verkäst. Peritoneum parietale stellenweise mit Tuberkeln besetzt. Omentum stark verdickt, verkäst. Milz kolossal vergrößert, mit vielen und großen nekrotischen Herden. Leber vergrößert, mit zum Teil großen, käsigen Herden durchsetzt. Mäßiges Exsudat in Peritoneal- und Pleurahöhlen. Nieren groß und blaß, mit einigen bacillenhaltigen miliaren Tuberkeln. Lungen mit zahlreichen großen, konfluierenden, zum Teil verkästen Tuberkeln durchsetzt.

Meerschweinchen No. 24.

Mit Eiter von No. 6 geimpft. 225 g. Tod nach 61 Tagen. 295 g.

Sektionsprotokoll: Befund ähnlich wie beim vorigen. Omentum verdickt

und verkäst. Leber und Milz weniger vergrößert. Drüsen vergrößert und verkäst. Tuberkelbacillen mikroskopisch nachgewiesen.

Aus diesen Versuchen muß geschlossen werden, daß in dem aus Höchst bezogenen Präparate „Zerriebene Tuberkelbacillen" virulente Koch'sche Bacillen enthalten waren. Während des Verlaufes dieser Versuchsreihe erschien eine Mitteilung von von Niessen (13), der mit den „zerriebenen Bacillen" Serumröhrchen impfte und Reinkulturen von Tuberkelbacillen erhalten zu haben angiebt.

Wenn nun aber in dem trockenen Präparate (das ja nicht direkt benutzt wird) virulente Tuberkelbacillen enthalten sind, so muß man sich fragen, ob nicht einzelne davon in die Bacillenemulsion übergehen könnten. Und diese Möglichkeit ist theoretisch durchaus zuzugeben. 50-proz. Glycerin wird sie nicht abtöten. Karbolzusatz zur Emulsion findet nicht statt. Für Herstellung der Verdünnungen ist nach Koch geringer Karbolzusatz gestattet, aber nicht vorgeschrieben. Centrifugiert wird für die subkutanen Injektionen nicht (was überdies wegen der dickflüssigen Beschaffenheit der Emulsion auch keine Gewähr für das Ausfällen vereinzelter Bacillen giebt), sondern nur einige Tage stehen gelassen und die Flüssigkeit vom Bodensatze abgegossen. Bei dem hohen spezifischen Gewichte der Emulsion könnten sich wohl Bacillen darin schwebend erhalten. Um zu sehen, ob sich experimentell ein Anhaltspunkt für diese Vermutung finden lasse, wurden 2 Meerschweinchen mit dieser Bacillenemulsion subkutan geimpft, und zwar ausschließlich mit dem direkt aus Höchst bezogenen Präparate Neutuberkulin „Bacillenemulsion", in Dosen bis zu 5 mg. Die Tiere zeigten keine besonderen Symptome und nahmen beständig an Gewicht zu. Nach 101 Tagen wurden sie getötet.

Meerschweinchen No. 13 und No. 14.

Nur mit dem Höchster Präparat Neutuberknlin (Bacillenemulsion) geimpft.

	No. 13			No. 14		
Datum	Gewicht	Dosen	Agglutination	Gewicht	Dosen	Agglutination
8. I.	250 g	0,005 mg		300 g	0,005 mg	
10. I.	270 „	0,015 „		315 „	0,015 „	
13. I.		0,05 „		310 „	0,05 „	
17. I.	265 „	0,1 „		310 „	0,1 „	
28. I.	270 „	0,3 „	—	320 „	0,3 „	
30. I.		1 „		330 „	1 „	
1. II.	280 „	1 „		330 „	1 „	
5. II.		2 „			2 „	
14. II.	310 „	3,5 „		360 „	3,5 „	
24. II.		4,5 „		390 „	5 „	+ 1:5
11. III.	400 „		+ 1:5	460 „		+ 1:5?
25. IV.	470 „	getötet	—	580 „	getötet	—

Sektionsprotokoll von No. 13: In der vorderen Bauchwand ein kleiner käsiger Absceß. Inguinale und retroperitoneale Drüsen nicht vergrößert. Milz mäßig vergrökert, enthält ziemlich zahlreiche miliare, kaum verkäste Tuberkel. Omentum und Leber normal. Retrosternale und tracheobronchiale Drüsen stark vergrößert, verkäst. In den Lungen einige miliare Tuberkel. Im Eiter der retrosternalen Drüsen ziemlich zahlreiche, zum Teil lange Bacillen.

Sektionsprotokoll von No. 14: Unterleibsorgane mit Lymphdrüsen normal. 3 mäßig vergrößerte, aber verkäste Bronchialdrüsen. Im Drüseneiter säurefeste Stäbchen, die mit großer Wahrscheinlichkeit Tuberkelbacillen waren. In den Lungen kleinste graue Knötchen, wenig zahlreich. In Schnittpräparaten erwiesen sich dieselben als

tuberkelähnliche Bildungen, doch waren weder Riesenzellen, noch Nekrose, noch Tuberkelbacillen nachweisbar.

Bei diesem Resultate mußten alle Fehlerquellen genau ausgeschlossen werden. Die Injektionen wurden immer mit peinlicher Sauberkeit gemacht, die Spritze vor und nach dem Gebrauche immer längere Zeit ausgekocht. Die Tiere waren nie mit tuberkulösen im gleichen Stalle, sondern nur mit vorbehandelten der 2. Serie. Spontane Tuberkulose kam bei den Meerschweinchen des Institutes nicht zur Beobachtung. In den Ställen neben denjenigen dieser Tiere waren allerdings tuberkulöse, aber um Inhalationstuberkulose handelt es sich nicht, sondern der Bauchdeckenabsceß bei No. 13 deutet mit Sicherheit auf eine Infektion von dieser Stelle aus; und andererseits bestanden nie Ulcerationen an den Impfstellen, so daß von hier aus nachträglich im Stalle eine Infektion nicht erfolgen konnte. Gegen die Annahme einer durch tote Bacillen bewirkten Affektion sprach schon die große Anzahl und die Länge der bei No. 13 gefundenen Bacillen. Ferner wurde von einer retrosternalen Drüse von No. 13 ein Serumröhrchen geimpft, und es entwickelte sich eine Reinkultur von Tuberkelbacillen. Es bleibt somit nur übrig, anzunehmen, daß in dem aus Höchst bezogenen Präparate „Neutuberkulin, Bacillenemulsion“ virulente Tuberkelbacillen vorhanden waren. Für weitere therapeutische Versuche darf natürlich nur ein Präparat zur Anwendung kommen, das mit absoluter Sicherheit frei von lebenden Bacillen ist; ein solches zu liefern, wird der bewährten Fabrik gewiß gelingen.

Eines ziemlich konstanten Sektionsbefundes bei an experimenteller Tuberkulose gestorbenen Meerschweinchen (unabhängig von der Tuberkulinbehandlung) möchte ich noch beiläufig Erwähnung thun, da ich ihn nirgends ausdrücklich angegeben fand.

Unter 14 intraperitoneal infizierten Tieren fand ich 13mal eine Verdickung, Schrumpfung, Knötchenbildung und eventuell Verkäsung des Omentum maius, was ja für Tuberkulose charakteristisch ist. Im 14. Falle fand ich nur eine leichte Verdickung, deren tuberkulöse Natur zweifelhaft war. Unter 16 subkutan infizierten Tieren dagegen war bei 11 das Netz dünn und glatt; in 2 Fällen fand sich eine zweifelhafte leichte Verdickung. In 3 Fällen war das Netz sicher tuberkulös erkrankt; aber in allen diesen Fällen fanden sich Adhäsionen (2mal mit der Bauchwand, 1mal mit der Milz); das Netz war jeweilen nur an der Stelle, wo es verklebt war, erkrankt, so daß der tuberkulöse Prozeß von den Bauchdecken resp. von der Milz kontinuierlich auf das Omentum fortgeschritten sein konnte.

Aehnliche Verhältnisse ergeben sich aus den Sektionsprotokollen der Arbeit von Menzi (14). Von 8 intraperitoneal geimpften Tieren hatten 7 Tuberkulose des Omentum, beim 8. war dasselbe normal. Ein subkutan geimpftes Tier hatte ein normales Netz. Ferner ersah ich aus der Arbeit von Tobler (15), daß dieses Verhalten auch für andere säurefeste Bacillen gilt: 5 intraperitoneal mit solchen geimpfte Meerschweinchen zeigten Verdickung des Netzes, 1 subkutan geimpftes nicht.

Aus diesem Verhalten läßt sich vermuten, daß die tuberkulöse Erkrankung des Netzes meist eine lokal bedingte, durch Eindringen von Bacillen direkt von der Bauchhöhle resp. von mit dem Netz verlöteten Organen aus zustandekommende, nicht eine metastatische ist. Anders verhält es sich mit der Tuberkulose der Leber und der Milz. Diese fand sich sowohl bei subkutaner als bei intraperitonealer Infektion, und

es erkranken also wohl diese Organe metastatisch, auf hämatogenem Wege. Mit großer Regelmäßigkeit sind ferner die retrosternalen (hinter dem Manubrium sterni gelegenen) Lymphdrüsen vergrößert und meist verkäst.

Die Resultate unserer Versuche können wir folgendermaßen zusammenfassen:

1) Die Agglutination der Tuberkelbacillen tritt bei Tuberkulose nicht regelmäßig auf; diese Reaktion kann somit zur Zeit nicht als ein praktisch brauchbares diagnostisches Merkmal betrachtet werden.

2) Durch subkutane Injektion von Koch's „Bacillenemulsion" in Dosen von einigen Milligrammen läßt sich dem Blutserum von Meerschweinchen die Fähigkeit erteilen, Tuberkelbacillen zu agglutinieren. Nach unseren Untersuchungen waren die Agglutinationswerte bei tuberkulösen Tieren größer als bei nicht tuberkulösen. Bei Kaninchen ließ sich die agglutinierende Fähigkeit nur schwer erzielen.

3) Ein günstiger Einfluß des Neutuberkulin Koch (Bacillenemulsion) auf den Verlauf experimenteller Tuberkulose bei Meerschweinchen und Kaninchen konnte in unseren Versuchen nicht beobachtet werden.

4) Zwei mit dem Höchster Präparate „Zerriebene Tuberkelbacillen". geimpfte Meerschweinchen starben an Tuberkulose; von zwei mit dem aus Höchst bezogenen Präparate „Neutuberkulin Koch, Bacillenemulsion" geimpften Meerschweinchen wurde eines tuberkulös. Die beiden Präparate enthielten lebensfähige, für Meerschweinchen virulente Tuberkelbacillen.

Zum Schlusse erfülle ich die angenehme Pflicht, Herrn Prof. Dr. O. Wyss für die gütige Ueberlassung des gesamten Materiales und Herrn Docenten Dr. Silberschmidt für die Anregung zu dieser Arbeit und für seinen stets mit liebenswürdigster Bereitwilligkeit erteilten Rat meinen herzlichsten Dank auszusprechen.

Litteratur.

1) Arloing, Agglutination du bacille de la tuberculose vraie. (Compt. rend. de l'acad. d. scienc. 1898. Mai. — Arloing et Courmont, Sur le sérodiagnostic de la tuberculose. (Province médicale. 1901. No. 35.)

2) Koch, Robert, Ueber die Agglutination der Tuberkelbacillen und die Verwertung dieser Agglutination. (Deutsche med. Wochenschr. 1901. No. 48.)

3) Romberg, Mitteilungen zur Serumdiagnose der Tuberkulose. (Münchener med. Wochenschr. 1902. No. 3.)

4) Rumpf und Guignard, Ueber die Agglutination der Tuberkelbacillen und die Verwertung dieser Agglutination. (Deutsche med. Wochenschr. 1902. No. 8.)

5) Ferrán, Nouvelles découvertes sur le bacille de la tuberculose etc. 1897.

6) Bendix, Zur Serumreaktion der Tuberkulose. (Deutsche med. Wochenschr. 1900. No. 14.)

7) Fränkel, C., Untersuchungen über die Serumdiagnose der Tuberkulose etc. (Hygien. Rundschau. 1900. No. 13.)

8) Beck und Rabinowitsch, Lydia, Ueber den Wert der Courmont'schen Serumreaktion für die Frühdiagnose der Tuberkulose. (Deutsche med. Wochenschr. 1900. No. 25.)

9) Garcia, Die Serumdiagnose der Lungentuberkulose. (Berl. klin. Wochenschr. 1902. No. 11 u. 12.)

10) Deutsch, Contribution à l'étude de l'origine des anticorps typhiques. (Annal. de l'Inst. Pasteur. 1899.)

11) Castellani, Ueber das Verhältnis der Agglutinine zu den Schutzkörpern. (Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. Bd. XXXVII.)

12) Salimbeni, Taurelli, Recherches sur l'immunité dans le choléra. (Annal. de l'Inst. Pasteur. 1897.)
13) von Niessen, Ein Protest gegen Koch's Tuberkulosierung. (Wiener med. Wochenschr. 1902. No. 5.)
14) Menzi, Beitrag zur Züchtung und zur Biologie des Tuberkelbacillus. (Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. Bd. XXXIX.)
15) Tobler, Maria, Zur Frage des Vorkommens von Tuberkelbacillen und anderen säurefesten Bacillen in der Marktbutter. (Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. Bd. XXXVI.)

Der gegenwärtige Stand der Lehre von den Cytolysinen und die cytolytische Theorie der Immunität.

[Aus der Abteilung für allgemeine Pathologie des Kaiserlichen Institutes für experimentelle Medizin in St. Petersburg.]

Von **E. S. London.**

I. Einleitung.

Unter den Fragen, mit welchen sich gegenwärtig die experimentelle Medizin beschäftigt, kommt der erste Platz entschieden der Frage von der Immunität zu, d. h. der Frage vom Schutze des Organismus gegen fremde Zellelemente; die interessantesten Abschnitte der Lehre von der Immunität aber nehmen die Cytolysine ein.

Die zelligen Elemente äußern ihre schädliche Einwirkung auf zweierlei Art. Einerseits schaden dieselben an und für sich durch ihre Einmischung in die normalen Lebensprozesse des Organismus, andererseits macht sich ihre Anwesenheit häufig durch die Giftstoffe fühlbar, welche von ihnen gebildet werden. Hieraus erwächst für den Organismus im Kampfe mit den heterogenen Elementen eine doppelte Aufgabe.

Erstens muß der Organismus diese Elemente selbst vernichten, zweitens muß er die von denselben ausgeschiedenen Gifte unschädlich machen. Dementsprechend entwickelt der Organismus zweierlei Substanzen: Cytolysine und Antitoxine. Die ersteren sind zur Zerstörung der zelligen Elemente selbst bestimmt, daher der Name „Cytolysine“, was wörtlich „Zellenzerstörer“ bedeutet. Die letzteren Substanzen dienen zur Neutralisierung, Bindung der Gifte, daher die Benennung „Antitoxine“, was so viel als „Gegengifte“ heißt.

Cytolysin ist eine Gesamtbezeichnung. Dieselbe umfaßt sämtliche bisher bekannten Stoffe, welche der Organismus entwickelt zur Zerstörung von Bakterien (Bakteriolysine), roten Blutkörperchen (Hämolysine), Spermatozoen (Spermolysine), Flimmerepithel (Tricholysine), Nieren (Nephrolysine), Pankreas (Pankreatolysine) u. s. w. Die Geschichte der Cytolysine beginnt mit dem Zeitpunkte, wo Buchner im Blutserum die Anwesenheit von Stoffen nachwies, welche auf Bakterien eine zerstörende Wirkung ausüben und daher als baktericide Substanzen bezeichnet wurden. Dieses geschah vor etwa 10 Jahren. Alle übrigen Lysine bilden die wissenschaftliche Errungenschaft der letzten paar Jahre.

Gegenwärtig beschäftigen sich mit der Frage von den Cytolysinen so manche wissenschaftlichen Institute. Wir wollen vor allem auf die Laboratorien von J. Metschnikoff in Frankreich, P. Ehrlich in Deutsch-

land, S. M. Lukjanow, sowie auch von N. J. Tschistowitsch und J. T. Sawtschenko in Rußland hinweisen.

Nicht alle Substanzen, die auf Zellen eine zerstörende Wirkung ausüben, können unter dem Begriffe „Cytolysine" zusammengefaßt werden. Diese Bezeichnung hat einen bedingten Sinn. Um eine Substanz in die Zahl der Cytolysine einreihen zu können, muß dieselbe 1) ein Produkt eines Organismus sein, 2) seine cytolytische Fähigkeit bei halbstündigem Erwärmen auf 55° C einbüßen und 3) eine elektive Affinität zu einer bestimmten Art von Zellelementen an den Tag legen.

Diejenigen Hämolysine, welche in den Kulturen einiger Bakterienformen nachgewiesen werden, gehören nach dem Gesagten nicht hierher. Dieselben sind als besondere Gruppe abzutrennen und als bakteriogene Hämolysine zu bezeichnen.

Man unterscheidet drei Arten von Cytolysinen, welche zwar die gleichen Grundeigenschaften aufweisen, sich jedoch in der Entstehungsweise voneinander unterscheiden.

Die am meisten verbreiteten Cytolysine sind die physiologischen. Dieselben bilden einen normalen Besitz des gesunden Organismus. Von diesen unterscheiden sich die pathologischen Cytolysine, welche unter gewissen pathologischen Bedingungen produziert werden.

Die beiden genannten Arten verdanken ihre Entstehung ausschließlich den dem Organismen innewohnenden natürlichen Fähigkeiten, ohne Beteiligung irgendwelcher Einspritzungen. Nach der vorherrschenden Meinung sind die natürlichen und pathologischen Cytolysine Produkte des normalen resp. pathologischen Stoffwechsels der Zellen. Die künstlichen Cytolysine unterscheiden sich dadurch, daß ihr Auftreten nach unserer Willkür vermittelst künstlicher Maßnahmen hervorgerufen wird.

Wir wollen zunächst die allen drei Kategorien von Cytolysinen gemeinsamen Eigenschaften besprechen und sodann zur Beschreibung der einzelnen Kategorieen übergehen.

II. Allgemeine Eigenschaften der Cytolysine.

Die allgemeinste Eigenschaft der Cytolysine ist die Duplicität ihrer Zusammensetzung. Ein jegliches Cytolysin besteht aus zwei Elementen, welche keineswegs miteinander verbunden sind, sondern vollkommen selbständig existieren und wirken. Die Selbständigkeit dieser Elemente wird dadurch bewiesen, daß im Falle der Elimination eines derselben aus dem aktiven Medium das andere unberührt bleibt und die Fähigkeit bewahrt, bei erster Gelegenheit seine Anwesenheit zu bekunden. Die gegenseitige Unabhängigkeit der Cytolysinelemente äußert sich ferner darin, daß dieselben in verschiedenem Serum auch einzeln vorkommen und mithin die Anwesenheit des einen derselben keineswegs das Vorhandensein des anderen durchaus voraussetzt. Mit einem Worte, der Prozeß der Cytolyse ist die Aeußerung der kombinierten Wirkung zweier Substanzen, welche sich zwar in dem gleichen Ziele, nämlich der Vernichtung einer bestimmten Art von Zellelementen, vereinigen, dabei aber voneinander unabhängig existieren und wirken.

Die verschiedenen Forscher haben diese Elemente mit mannigfachen Namen benannt. Für das eine derselben erfand man die Bezeichnungen: Immunkörper, Amboceptor, Zwischenkörper, Substance sensibilisatrice, Copula, Desmon, philocytase, fixateur, Immunisin, für das andere die Benennungen: Alexin, Komplement, Addiment, Cytase. Aus der großen Zahl dieser Namen ist klar ersichtlich,

daß nicht einer unter denselben seine Existenz in ganz tadelloser Weise rechtfertigen kann. Uns erscheinen die Bezeichnungen Desmon für das eine und Alexin für das andere Element als die ausdrucksvollsten.

Die komplizierte Zusammensetzung des Cytolysins läßt sich auf folgende Art beweisen: Unterwirft man ein cytolytisches Serum einer halbstündigen Erwärmung auf 56° C, so verliert dasselbe seine cytolytische Fähigkeit vollkommen, und man könnte glauben, das betreffende Cytolysin sei vollständig zerstört. In der That verhält es sich jedoch anders. Die cytolytische Fähigkeit eines so erwärmten Serums wird nämlich vollkommen und bisweilen sogar mit einem gewissen Ueberschuß wieder hergestellt, sobald man dasselbe mit dem gleichen Volumen eines normalen Serums versetzt, welches für sich allein die betreffende cytolytische Fähigkeit nicht besitzt. Es kann mithin weder das vorerwärmte cytolytische Serum noch das normale Serum für sich allein genommen eine cytolytische Wirkung entfalten, und doch bringt die Mischung dieser beiden indifferenten Serumarten einen kräftigen cytolytischen Effekt zustande. Würde man zur Zusammensetzung des soeben genannten Gemisches anstatt des vorerwärmten cytolytischen ein vorerwärmtes normales, nicht cytolytisches Serum verwenden, so erhielte man eine indifferente Mischung. Es ist klar, daß das vorerwärmte cytolytische Serum ein Element des Cytolysins enthält, welches der schädigenden Einwirkung der erhöhten Temperatur entgeht. Das andere Element des Cytolysins, welches durch die hohe Temperatur zerstört wurde, kann auch im normalen, nicht cytolytischen Serum enthalten sein. Daher wird die cytolytische Fähigkeit des vorerwärmten Serums wiederhergestellt, wenn man dasselbe mit dem entsprechenden nicht cytolytischen Serum versetzt.

Wenn es richtig ist, daß das nicht cytolytische Serum dem vorerwähnten cytolytischen Serum gerade das mitbringt, was die hohe Temperatur in dem letzteren zerstört hat, so müssen wir erwarten, daß der Zusatz von nicht cytolytischem Serum, welches vorher eine halbe Stunde lang auf 56° C erwärmt wurde, ohne Erfolg bleiben werde. Dieses wird durch den Versuch vollkommen bestätigt. Versetzt man das vorerwärmte cytolytische Serum mit einem ebenfalls vorerwärmten nicht cytolytischen, so wird das Cytolysin nicht wiederhergestellt.

Dasjenige Element des Cytolysins, welches der Temperaturerhöhung widersteht, läßt konstant folgenden Charakterzug erkennen: Dasselbe verbindet sich eng mit den vorhandenen Zellen, wofern nur die letzteren der Einwirkung des betreffenden Cytolysins unterliegen. Diese Eigenschaft rechtfertigt vollkommen die für das genannte Element vorgeschlagene Bezeichnung „Desmon“ (*δέω* — ich binde). Das andere Element des Cytolysins ist am meisten unter dem Namen „Alexin“ bekannt.

Somit setzt sich das Cytolysin aus dem Cytodesmon und dem Cytoalexin oder einfach aus dem Desmon und dem Alexin zusammen.

Will man das Desmon isolieren, so hält man das betreffende Serum eine halbe Stunde lang bei 56° C. Das Alexin wird dadurch zerstört, während das Desmon unversehrt bleibt.

Es giebt noch eine andere Art, das Desmon zu isolieren; man neutralisiert das Serum mit Schwefel- oder Salzsäure. Die Neutralisation bewirkt eine Ausschaltung des Alexins, während das Desmon unversehrt bleibt. Ich sage „Ausschaltung“ und nicht „Zerstörung“,

denn sobald man dem Serum wieder seine frühere Reaktion erteilt, findet eine Wiederherstellung des Alexins statt. Hierin unterscheidet sich die Neutralisation von der Erwärmung: Das durch erhöhte Temperatur zerstörte Alexin wird bei nachfolgender Abkühlung nicht mehr wiederhergestellt. Eine dritte Art der Isolierung des Desmon besteht darin, daß man das Cytolysin mit einer genügenden Menge des entsprechenden Antialexins zusammenbringt; dadurch wird die Wirkungsfähigkeit des Alexins aufgehoben.

In manchen Fällen kann es wünschenswert sein, das Alexin zu isolieren und das Desmon zu beseitigen. Um dieses zu erreichen, muß man das cytolysinhaltige Serum mit den betreffenden Zellelementen in Berührung bringen und so einige Zeit auf Eis halten. Dann geht das Desmon eine Verbindung mit den Zellen ein, während das Alexin frei bleibt und mit der Flüssigkeit, d. h. dem Serum oder der physiologischen Salzlösung, abgetrennt werden kann. Auf eine andere Art kann das Alexin isoliert werden, indem man das cytolytische Serum mit der nötigen Menge des entsprechenden Antidesmon versetzt, wodurch die Wirkungskraft des Desmon unterdrückt wird.

Zu den allgemeinen Eigenschaften der Cytolysine gehört ferner ihre Specifität. In dieser Hinsicht werfen sich uns zwei Fragen auf: 1) Ist die Funktion der Cytolysine eine streng spezialisierte, mit anderen Worten, besitzt jede einzelne Gattung Cytolysin eine ganz bestimmte Funktion oder kann eine Gattung auch die Funktion einer anderen Gattung übernehmen? Noch konkreter könnten wir die Frage so stellen: Kann wohl ein Hämolysin bakteriolytische Eigenschaften, ein Bakteriolysin hämolytische, ein Hämolysin spermolytische, ein Spermolysin hämolytische Eigenschaften an den Tag legen? 2) Besitzt eine jede Art Cytolysin nur Affinität zu den betreffenden Zellelementen einer einzigen Tierspecies, oder spielt die Tierspecies hier keine Rolle?

Bei dieser Gelegenheit will ich bemerken, daß die Cytolysingattung durch diejenige Kategorie von Zellelementen bestimmt wird, zu welcher dieselbe in Beziehung steht, als Erythrocyten, Leukocyten, Spermatozoen, Flimmerepithelien, Bakterien u. s. w. Eine Cytolysingattung umfaßt eine große Zahl von Arten, deren jede auf die betreffenden Zellelemente einer bestimmten Tierart einwirkt.

Was nun die erste Frage betrifft, so dürfen wir auf Grund der vorhandenen Daten dieselbe folgendermaßen beantworten: Jede Cytolysingattung, das Bakteriolysin, das Hämolysin, das Spermolysin u. s. w., übt als Ganzes genommen seine Wirkung nur auf eine bestimmte Gattung von Zellelementen aus: Das Bakteriolysin wirkt nur auf Bakterien ein, das Hämolysin nur auf rote Blutkörperchen, das Leukolysin nur auf weiße Blutkörperchen, das Spermolysin nur auf Spermatozoen, das Tricholysin nur auf Flimmerepithelien u. s. w. Uebrigens dürfen wir über das Tricholysin bis auf weitere Forschungen in dieser Beziehung nur mit Vorsicht reden.

Das Gesagte bezieht sich, wie schon erwähnt, nur auf heile Cytolysine; die einzelnen Cytolysinelemente lassen, wie es scheint, ein anderes Verhalten erkennen. Es ist z. B. erwiesen, daß das Desmon des Spermolysins, also das Spermodesmon, gegen rote Blutkörperchen die Wirkung eines Hämodesmon an den Tag legt. Ob diese Erscheinung als allgemeine Regel oder im Gegenteil nur als Ausnahme von der Regel aufzufassen ist, wäre schwer zu sagen. Alles, was wir bisher wissen, spricht zu Gunsten der letzteren Annahme. So ist z. B. er-

wiesen, daß ein umgekehrtes Verhalten der Desmone sich nicht bestätigt, d. h. das Hämodesmon ist jeglicher spermodesmonischen Fähigkeiten bar.

Die Frage von der Specifität der cytolytischen Arten ist von ihrer endgiltigen Lösung noch weit entfernt. Vor der Hand läßt sich nur sagen: Die Specifität der cytolytischen Art hält sich nicht an die Schranken der zoologischen Klassifikation und wird von anderen Prinzipien geleitet als diese.

Wir wollen das Gesagte an einem Beispiele erläutern. Man kann am Kaninchen das Auftreten eines solchen Hämolysins hervorrufen, welches mit großer Energie die roten Blutkörperchen des menschlichen Blutes löst. Gegen die roten Blutkörperchen des Meerschweinchens, des Kaninchens, des Pferdes, des Hundes, der Katze, der Taube, des Huhnes, des Hammels, des Rindes u. s. w. wird ein solches Hämolysin vollkommen inaktiv sein, aber gegen die roten Blutkörperchen des Affen wird dasselbe sich genau so verhalten, als wenn diese vom Menschen herstammten. Ein Hämolysin zu gewinnen, welches ausschließlich für menschliche Erythrocyten spezifisch wäre, gelingt nicht.

Aehnliche Erscheinungen sehen wir auch bei den Spermolysinen. Es ist erwiesen, daß Spermolysin, welches Spermatozoen von Kaninchen zerstört, dieselbe vernichtende Wirkung auch auf Spermatozoen von Meerschweinchen ausübt.

Man könnte noch viele ähnliche Beispiele anführen, und man kann im allgemeinen gewiß behaupten, daß die zwischen den Tierarten des zoologischen Systems festgestellte Verwandtschaft, wenigstens hinsichtlich einiger Gruppen von Zellen, eine nähere ist, als man erwarten könnte. Es ist durchaus nicht unwahrscheinlich, daß die Lehre von den Cytolysinen in vielleicht nicht allzu ferner Zukunft einen gewissen Einfluß auf die zoologische Klassifikation gewinnen wird.

Wir wollen nun zur Frage von der Wirkung der Cytolysine übergehen.

Die Elemente des Cytolysins sind, wie bereits oben erwähnt, durch nichts miteinander verbunden und besitzen eine vollkommen selbständige Existenz. Dieses indifferente Verhalten zu einander bleibt jedoch nur bis zum Anfange der cytolytischen Wirkung bewahrt. Sobald ein für die Cytolyse geeignetes Objekt da ist, treten Alexin und Desmon sowohl in quantitativer als auch in qualitativer Hinsicht zu einander in ganz bestimmte Verhältnisse. Das quantitative Verhältnis äußert sich darin, daß nicht das ganze vorhandene Quantum von Alexin und Desmon in Funktion tritt. Damit sich Cytolysin bilde, ist es notwendig, daß auf eine Einheit Desmon die betreffende Einheit Alexin kommt; sobald daher eines der Elemente im Ueberschusse vorhanden ist, tritt nur ein solcher Teil desselben in Funktion, der zur Sättigung des anderen Elementes im Interesse der Bildung von heilem Cytolysin erforderlich ist. Der übrig gebliebene Teil des ersten Elementes aber nimmt an der Wirkung nicht teil und kann zur Sättigung neuer Quantitäten des anderen Elementes dienen.

Ein ebenso genau bestimmtes quantitatives Verhältnis tritt zwischen dem Cytolysin und den seiner Wirkung unterliegenden Zellelementen in seine Rechte. Bei Mangel an Cytolysin bleibt ein entsprechender Teil der Zellelemente unversehrt; umgekehrt bleibt bei Mangel an letzteren ein entsprechender Ueberschuß an Cytolysin unverbraucht.

Der folgende Versuch veranschaulicht das eben Gesagte. Nehmen wir ein Reagenzglas, welches 1 ccm Blutemulsion enthält. Gießen wir in dasselbe soviel eines hämolytischen Serums, als zur Auflösung der doppelten Menge roter Blutkörperchen genügen würde. Die Auflösung ist eingetreten. Wenn das, was wir sagten, richtig war, so steht zu erwarten, daß die roten Blutkörperchen, die wir mit einem zweiten Kubikcentimeter Emulsion hineinbringen, ebenfalls der Auflösung unterliegen werden. Setzen wir einen zweiten Kubikcentimeter Blutemulsion hinzu, so geht in wenigen Minuten die Auflösung der suspendierten Erythrocyten vor sich.

Das qualitative Verhältnis der am cytolytischen Prozeß teilnehmenden Elemente äußert sich darin, daß das Desmon mit den Zellelementen in eine enge chemische Verbindung tritt, wodurch die letzteren natürlich Veränderungen erleiden. Diese Veränderungen sind nicht nur chemische, sondern auch morphologische, wovon man sich mit Hilfe des Mikroskopes leicht überzeugen kann. Nicht immer aber führen diese Veränderungen zu einer Herabsetzung der Lebensfunktionen der Zellen. So zeigen z. B. Spermatozoen, welche der Einwirkung von Spermodesmon ausgesetzt werden, eine noch lebhaftere Bewegung als vorher. Die Verbindung von Zellelementen mit Desmon zeichnet sich durch eine große Dauerhaftigkeit aus. Dieselbe wird häufig selbst dann nicht gelöst, wenn ihr Zerfall in einem Organismus eintritt. So ist z. B. bewiesen, daß die mit Desmon gesättigten Blutkörperchen oftmals die Fähigkeit verloren haben, im Organismus die Immunitätsreaktion auszulösen. Ein noch weniger konstantes Resultat wird erhalten, wenn man einem Tiere agglutinierte Bakterien (z. B. Typhusbacillen) einspritzt. Nur in seltenen Fällen wird hierbei eine Neubildung von Agglutininen beobachtet.

Das Alexin beginnt seine Thätigkeit erst nach dem Desmon. Sein Einfluß richtet sich gerade gegen diejenige Verbindung, welche durch die Wechselwirkung von Desmon und Zellsubstanz entstanden ist. Das Desmon also leitet die cytolytische Reaktion ein, welche das Alexin beschließt.

Hier gelangen wir zu der Frage: Wird ein Desmon nur durch eine ganz bestimmte Art von Alexin zu heilem Cytolysin ergänzt oder kann zu diesem Behufe jedes beliebige Alexin dienen, oder endlich, besitzt die einzelne Tierspecies überhaupt nur ein einziges Alexin?

In dieser Hinsicht herrscht in der Lehre von den Cytolysinen Meinungsverschiedenheit. Die Einen verteidigen die Ansicht, daß das Serum sämtlicher Tiere bloß ein Alexin enthält, welches zur Bildung aller Gattungen und Arten von Cytolysinen dient. Das ist die Theorie des Singularismus des Alexins. Andere huldigen der Theorie des Dualismus des Alexins. Nach dieser Theorie enthält ein jedes Serum 2 Alexine, die Makrocytase und die Mikrocytase; die Mikrocytase beteiligt sich an der Bakteriolyse, die Makrocytase an allen übrigen Arten von Cytolyse. Eine 3. Gruppe endlich vertritt die Meinung, daß nicht nur jede Gattung, sondern sogar jede Art von Cytolysin ihr spezifisches Alexin besitze, ja gar eine Menge verschiedenartiger Alexine. Dies ist die Theorie des Pluralismus der Alexine.

Es sind Versuche gemacht worden, die räumlichen Verhältnisse, in welche Zellelemente, Desmon und Alexin während der Cytolyse zu einander treten, genauer zu bestimmen. Wir denken hier an die sogenannte Seitenkettentheorie. Ungeachtet der Solidität etlicher Grundlagen, auf

denen die genannte scharfsinnige Theorie aufgebaut ist, werden gegen dieselben auch heute noch verschiedene Einwände erhoben.

Ueber den Charakter des cytolytischen Prozesses sind die Meinungen der Gelehrten noch uneinig. Die einen halten diesen Prozeß für die Aeußerung einer Fermentwirkung, andere nehmen hier Erscheinungen gemischten Charakters an, nämlich teils fermentative, teils toxische; wieder andere erblicken darin nur ein Spiel osmotischer Vorgänge.

Alles, was wir bisher gesagt haben, bezieht sich ebensowohl auf die natürlichen wie auf die künstlichen Cytolysine. Nun aber wollen wir unsere Aufmerksamkeit denjenigen Eigentümlichkeiten allgemeiner Art zuwenden, welche ausschließlich den künstlichen Cytolysinen angehören.

Wir haben hier die folgenden 3 Fragen zu beantworten:

1) Wie werden künstliche Cytolysine erzeugt?

2) In welchem Verhältnisse stehen die künstlichen Cytolysine zu den physiologischen?

3) Wo kommen die künstlichen Cytolysine zur Entwickelung?

Um die Bildung eines Cytolysins hervorzurufen, welches gegen eine in Aussicht genommene Gattung von Zellelementen einer bestimmten Tierart wirksam ist, muß man einem Tiere einer beliebigen, jedoch anderen Art gerade diese Gattung von Zellelementen unter die Haut oder in die Peritonealhöhle hineinbringen. Es werden entweder einmalig große Dosen oder mehrmalig kleine Dosen einverleibt. Das letztere Immunisierungsverfahren hat vor dem ersteren den Vorzug, daß es vom Tiere besser vertragen wird.

Wir sagten, daß man zur Immunisierung ein beliebiges Tier verwenden könne, wofern nur dasselbe einer anderen Art angehört als das Tier, welches das Injektionsmaterial liefert. Im allgemeinen ist dieses zwar richtig, doch müssen wir hier eine Beschränkung vornehmen. Der Zweck der Immunisierung ist nämlich die Bildung heilen Cytolysins, als unmittelbares Resultat der Immunisierung aber tritt bloß die Bildung des Desmon auf. Besitzt nun das immunisierte Tier das für den gegebenen Fall notwendige Alexin, so wird das Ziel vollkommen erreicht, im entgegengesetzten Falle aber erreichen wir dasselbe nur teilweise: Wir erhalten das künstliche Desmon, und wollen wir heiles Cytolysin erhalten, so müssen wir zu einem solchen fremden Serum, welches das gesuchte Alexin enthält, unsere Zuflucht nehmen.

Wir wollen das Gesagte an einem speziellen Beispiele erläutern: Ein Kaninchen ist mit Spermatozoen von Meerschweinchen immunisiert worden. Prüfen wir das Verhalten des Serums dieses Kaninchens gegen die Spermatozoen eines Meerschweinchens, so erweist sich, daß dasselbe sich ebenso oder fast ebenso verhält, wie das Serum eines jeden beliebigen anderen, nicht immunisierten Kaninchens. Das unmittelbare Ziel der Immunisierung ist mithin nicht erreicht. Wir brauchen aber nur dieses Serum des immunisierten Kaninchens mit dem Serum eines normalen Meerschweinchens zu vermengen und wir erhalten ein Medium, welches eine große spermolytische Kraft entfaltet. Diese Erscheinung läßt nur eine einzige Erklärung zu: Unter dem Einflusse der Immunisierung hatte unser Kaninchen ein Spermodesmon entwickelt, welches kein passendes Spermoalexin vorfand und deshalb kein heiles Spermolysin bilden konnte. Die Bildung des letzteren kam erst dann zustande, als wir mit dem Serum des normalen Meerschweinchens das nötige Spermoalexin hineinbrachten.

Wir sehen also, daß als Produkt der Immunisierung bloß das Desmon erscheint. Ein künstliches Cytolysin ist eine Kombination von künstlichem Desmon mit einem entsprechenden physiologischen Alexin.

Es fragt sich nun, wo das künstliche Desmon herkommt.

Die Versuche haben gelehrt, daß diejenigen Forscher, welche das künstliche Desmon als das Produkt einer gesteigerten Entwickelung von physiologischem Desmon ansahen, im Irrtume waren. Das Fehlerhafte dieses Gesichtspunktes wird dadurch bewiesen, daß das künstliche Desmon nicht in allen Beziehungen seinem physiologischen Prototypus ähnlich ist. Mehr Wahrscheinlichkeit hat die Anschauung für sich, das künstliche Desmon sei eine Modifikation des physiologischen Prototypus. Daß die künstlichen Cytolysine sich von den physiologischen qualitativ unterscheiden, ist unter anderem aus ihrem verschiedenen Verhalten gegen die Dialyse ersichtlich. So sind z. B. Angaben vorhanden, daß das physiologische Hämolysin der Dialyse nicht widersteht, während das entsprechende künstliche Hämolysin bei der Dialyse unberührt bleibt. Da kein Grund zur Annahme vorliegt, das Hämolysin verhalte sich der Dialyse gegenüber anders als jedes beliebige andere Cytolysin, so scheint die Annahme statthaft, daß der genannte Unterschied eine allgemeine Eigenschaft der Cytolysine bedeute. Wir wollen hier gelegentlich bemerken, daß die hämolytische Kraft von Transsudaten meist geringer, manchmal sogar bedeutend geringer ist als diejenige des Blutserums. Die serösen Häute lassen also das Hämolysin nicht unbehindert passieren.

Der Mechanismus, durch welchen der Organismus die künstlichen Desmone zustande bringt, ist noch völlig unaufgeklärt. Unzweifelhaft ist nur, daß an der Bildung derselben gewisse Organe besonders beteiligt sind, und daß zur Herstellung verschiedener Gattungen von Desmonen verschiedene Organe herangezogen werden. So ist z. B. erwiesen, daß bei der Entwickelung der künstlichen Hämolysine die Milz sowie das Epiploon und die Mesenterialdrüsen eine hervorragende Rolle spielen, und daß dagegen diese Organe an der Bildung von Spermodesmon keineswegs teilnehmen.

Ferner besteht noch die Ansicht, daß sämtliche Desmone von den Phagocyten entwickelt werden, während die Alexine sich in den Leukocyten präformiert finden; das Plasma enthalte keine Alexine, erst im Serum treten dieselben auf infolge des Zerfalles von Leukocyten.

Außer den natürlichen und künstlichen Cytolysinen giebt es noch, wie oben erwähnt, pathologische. Die letzteren hat man hauptsächlich bei malignen Neubildungen, Anämie und dergleichen schweren Erkrankungen, beobachtet. Bisher sind besonders die pathologischen Hämolysine und unter diesen vorzugsweise die Isohämolysine erforscht worden. Es ist anzunehmen, daß die pathologischen Cytolysine für die Entwickelung pathologischer Vorgänge von nicht geringer Bedeutung sind.

Das ist in kurzen Worten Alles, was sich augenblicklich über die allgemeinen Eigenschaften der Cytolysine sagen läßt.

Wir wollen nun zur Schilderung derjenigen Eigentümlichkeiten schreiten, durch welche sich die einzelnen Gattungen und Arten der Cytolysine kennzeichnen.

III. Die verschiedenen Gattungen der Cytolysine.

Am genauesten sind die Hämolysine erforscht. Dieselben mögen daher den Anfang machen.

Die Hämolysine bieten im Gegensatze zu den übrigen Cytolysinen folgende Charaktereigentümlichkeiten dar:

Erstens bringen die Hämolysine ihre Opfer zur fast völligen Zerstörung und Lösung in der umgebenden Flüssigkeit. Das Gleiche läßt sich von keiner einzigen der übrigen bisher bekannten Cytolysingattungen sagen, denn selbst in den ausgeprägtesten Fällen geht es über eine partielle Zerstörung der Zellsubstanz nicht hinaus.

Zweitens bringen die physiologischen Hämolysine besser als jedes andere Cytolysin den Grad der Verwandtschaft der Tiere im zoologischen Systeme zum Ausdrucke. So ist z. B. nicht ein einziges Tier bekannt, dessen normales Serum eine zerstörende Wirkung auf die roten Blutkörperchen eines anderen Individuums derselben Art zustande brächte. Mit anderen Worten: Es giebt keine physiologischen Isohämolysine. Ebenso lassen sich keine physiologischen Autohämolysine entdecken. Demgegenüber kennen wir jedoch viele Tierarten, deren Serum sich den roten Blutkörperchen heterogenen Blutes gegenüber fast völlig indifferent verhält. Eine derartige Erscheinung beobachtet man nur bei Tierarten, welche im Systeme einander nahe stehen, wie z. B. Hund und Katze. In den übrigen Fällen sind die hämolytischen Beziehungen bald mehr, bald weniger ausgeprägt. Die allgemeinen Prinzipien, durch welche das hämolytische Verhalten zwischen Tieren bestimmt wird, die im zoologischen Systeme auf verschiedener Höhe stehen, sind noch lange nicht mit der nötigen Genauigkeit festgestellt worden. Immerhin unterliegt es keinem Zweifel, daß die Höhe der Stellung im Systeme hier eine gewisse Bedeutung hat.

Wir wollen bei dieser Gelegenheit bemerken, daß verschiedene Blutarten in ihrem hämolytischen Verhalten keine Gegenseitigkeit erkennen lassen. Als Beispiel läßt sich das Blut der Katze und das des Kaninchens anführen. Das Serum der Katze übt auf die Erythrocyten des Kaninchenblutes eine starke deletäre Wirkung aus, wogegen das Serum des Kaninchens gegen die roten Blutkörperchen der Katze eine völlige Indifferenz an den Tag legt.

Drittens zeichnen sich die künstlichen Hämolysine durch einige besondere Eigenheiten aus. Die hervorragendsten derselben seien hier genannt:

Die zu wiederholten Malen angestellten Versuche, bei einem Tiere das Auftreten von Autohämolysinen durch Injizieren seines eigenen Blutes hervorzurufen, haben bisher zu keinem positiven Resultate geführt. Da jedoch in einigen pathologischen Zuständen, wie z. B. bei Anämie, Krebs, Sarkom, das Erscheinen von (pathologischen) Autohämolysinen beobachtet wird, so dürfen wir wohl annehmen, daß die künstliche Reproduktion derselben nur eine Frage der Zeit bildet, um so mehr, da das eine Element des Autohämolysins, nämlich das Autohämoalexin, im Serum stets zugegen ist. Aller Wahrscheinlichkeit nach muß das Tier in gewisse pathologische Verhältnisse versetzt werden, damit dasselbe das Autodesmon entwickele.

Anders verhält es sich mit dem künstlichen Isohämolysin. Um dasselbe herzustellen, müssen wir mehreren Tieren derselben Art homogenes Blut injizieren. Ich sage mehreren Tieren und nicht einem Tiere deshalb, weil in dieser Hinsicht große individuelle Unterschiede beobachtet werden. So läßt sich z. B. bei einzelnen Ziegen die Entwickelung großer Mengen von Isohämolysin hervorrufen, während es

bei anderen Ziegen nicht gelingt, auch nur Spuren dieses Stoffes zu erhalten.

Hieraus läßt sich unter anderem schließen, daß auch zwischen Tieren der gleichen Art verschiedene Grade von Verwandtschaft bestehen können, welche sich zwar nicht durch wahrnehmbare äußere Kennzeichen offenbaren, wohl aber mit Hilfe der hämolytischen Untersuchung konstatiert werden können.

Was schließlich die Heterohämolysine betrifft, so gelingt die Reproduktion derselben in vollem Maße sehr leicht, da die Mehrzahl der Tiere reichlich mit verschiedenen Hämoalexinen versehen ist. Als das in dieser Hinsicht reichste Tier hat sich bisher das Pferd erwiesen.

Bevor wir das Kapitel der Hämolysine schließen, wollen wir noch kurz der Anwendung derselben in der gerichtlichen Medizin erwähnen. Zahlreiche Untersuchungen haben festgestellt, daß im Blute eines mit defibriniertem Menschenblute immunisierten Kaninchens sich eine Substanz aufhäuft, welche bei ihrer Einwirkung auf menschliches Blut einen flockigen Niederschlag giebt, auch wenn dieses Menschenblut vorher der Eintrocknung unterworfen wurde. Einige Untersuchungen gestatten die Annahme, daß die nämliche Substanz bei einem Kaninchen auftritt, welches man mit Pleuraexsudat immunisiert, das durch Centrifugieren von den suspendierten Elementen befreit wurde, oder auch mit eiweißhaltigem Harne; sowohl das Pleuraexsudat als auch der Eiweißharn werden vom Menschen genommen. Dasselbe Resultat scheint erhalten zu werden, wenn man einem Kaninchen Affenblut injiziert. Die Reaktion ist eine äußerst empfindliche. Dieselbe offenbart die Provenienz eines Blutfleckens selbst in dem Falle, wenn der letztere dem Fäulnisprozesse anheimgefallen war. Weder große Hitze noch strenger Frost können den Blutflecken soweit verändern, daß derselbe der genannten Reaktion unzugänglich würde. Sogar im Waschwasser, in welchem mit Menschenblut befleckte Wäsche gespült worden war, läßt sich die Anwesenheit des Blutes mit Leichtigkeit nachweisen. Am Zustandekommen dieser Reaktion sind außer den Hämolysinen noch in hohem Maße die Präcipitine beteiligt. Die allerneuesten Untersuchungen veranlassen uns jedoch, einige Bemerkungen hinzuzufügen, welche den praktischen Wert der soeben erwähnten Reaktion in gewissem Grade beschränken. Vor allem wird darauf hingewiesen, daß das Blut der anthropoiden Affen, des Gorillas, des Orang-Utangs und des Shimpansen, diese Reaktion genau so liefert wie Menschenblut, wenigstens in derjenigen Fassung, in welcher dieselbe laut Angaben der Autoren gewöhnlich angestellt wird. Außerdem hat man darauf aufmerksam gemacht, daß man unter gewissen Bedingungen, so z. B. in dem Falle, wenn das zu untersuchende Blut nicht genügend verdünnt ist (mehr als 1 : 1000), sich irren kann, indem man das Blut des Ochsen, des Pferdes, des Hundes, des Hammels, des Schweines, des Meerschweinchens, des Küchels für Menschenblut hält.

Aehnlich wie das Blut, können wir auch das Fleisch eines Tieres von demjenigen eines anderen Tieres unterscheiden. Nicht die Muskelsubstanz, sondern das im Fleische verbliebene Blut giebt hier die Reaktion. Ebenso hat man ein Serum gewonnen, welches die Herkunft von Milch festzustellen ermöglicht.

Da wir eben von den Präcipitinen reden, wollen wir hier einen unlängst beschriebenen klinischen Fall von Albuminurie anführen, in welchem es gelang, mit Hilfe von spezifischem Serum zu beweisen, daß

das Eiweiß des Harnes nicht vom Organismus des Patienten, sondern aus der verzehrten Nahrung herstammte.

Ferner sind einige Versuche gemacht worden, die Hämolysine therapeutisch zu verwenden. Man ging hierbei von der Vermutung aus, wenn große Dosen des Hämolysins die roten Blutzellen zerstören, so würden kleine Dosen im Gegenteile die Bildung derselben erhöhen. Die Versuche, die in dieser Richtung am Menschen angestellt worden sind, ergaben ermunternde Resultate, welche übrigens wohl noch einer Nachprüfung bedürfen.

Gehen wir nun zu den Spermolysinen über, welche nächst den Hämolysinen am ausgiebigsten erforscht sind.

Die hervorragendste Eigentümlichkeit der Spermolysine ist ihre auto- und isolytische Wirkung. Es giebt wohl kaum ein Tier, dessen Serum sich sowohl den eigenen Spermatozoen gegenüber als auch denen der übrigen Individuen der gleichen Art gegenüber nicht feindlich verhielte. Wenn es statthaft ist, ein jedes Serum auto- und isohämophil zu nennen, so ist es ebenso statthaft, dasselbe als auto- und isospermophob zu bezeichnen. Es ist klar, daß zwischen den roten Blutkörperchen und dem Plasma andere Verhältnisse bestehen als zwischen den Spermatozoen und dem Plasma. Das ließ sich auch von vornherein erwarten: Sind doch die roten Blutzellen die Hauptfaktoren im Leben des Organismus, notwendige Attribute desselben, während die reifen Spermatozoen als fremde Elemente erscheinen, die der Organismus als etwas ihm nicht mehr Angehörendes, Unnützes zu eliminieren strebt.

Wenn also die Spermatozoen bereits beim gleichartigen Serum ein feindseliges Verhalten antreffen, so mußte man eben schon a priori erwarten, daß ein fremdartiges Serum denselben gegenüber eine noch größere Feindseligkeit an den Tag legen werde, als den betreffenden roten Blutkörperchen gegenüber, gegen welche das gleichartige Serum, wie oben erwähnt, ein völlig indifferentes Verhalten zeigt. So haben denn auch die Versuche ergeben, daß z. B. die Spermatozoen des Meerschweinchens einer 6—7mal stärkeren Einwirkung seitens Kaninchenserums unterliegen, als die roten Blutzellen desselben Tieres. Das bedeutet mit anderen Worten, daß ein und dasselbe Kaninchenserum imstande ist, 6—7mal mehr Spermatozoen als Blutkörperchen des Meerschweinchens zu bewältigen. Ob dieser spezielle Fall als Beispiel für eine allgemeine Regel dienen kann, ist vor der Hand schwer zu sagen; jedenfalls ist es bemerkenswert, daß schon der erste Versuch die theoretische Mutmaßung bestätigte.

Auf Grund des Gesagten war ferner die Annahme statthaft, das spermolytische Verhalten zwischen verschiedenen Tierarten falle mit dem hämolytischen Verhalten derselben nicht zusammen. Auch diese Voraussetzung ist durch das Experiment bestätigt worden. Man fand, daß das spermolytische Verhalten der Tierarten durch deren Stellung im zoologischen Systeme nicht bestimmt wird.

Die völlige Reproduktion künstlicher Spermolysine ist bei weitem nicht immer leicht erreichbar. Dieses erklärt sich dadurch, daß die Mehrzahl der Tiere mit den nötigen Spermoalexinen nur spärlich versehen ist, jedenfalls bedeutend spärlicher, als z. B. mit den Hämoalexinen, wodurch übrigens bewiesen wird, daß Hämoalexin und Spermoalexin nicht dasselbe ist.

Das Spermodesmon entsteht, wie wir annehmen müssen, bei jedem Tiere nach Injektion von Spermatozoen mit unwandelbarer Beständigkeit.

Wenn wir sein Auftreten nicht immer bei den immunisierten Tieren nachweisen können, so hat das seinen Grund darin, daß sich eben sein Vorhandensein nur mit Hilfe der betreffenden Spermoalexine nachweisen läßt, diese aber, wie soeben gesagt, schwer zu finden sind.

Die Spermolysine bieten außer allem anderen dadurch ein großes Interesse, daß sie gestatten, jene histologischen Veränderungen zu verfolgen, welche bei der Cytolyse durch die Wirkung von Desmon und Alexin in den betreffenden Zellelementen hervorgerufen werden. Diese Veränderungen sind, wie die Beobachtung gezeigt hat, dermaßen charakteristisch und deutlich, daß sie ohne sonderliche Mühe unter dem Mikroskope wahrgenommen werden können.

Die normalen Spermatozoen des Meerschweinchens besitzen bekanntlich folgende Teile: Die intensiv sich färbende Haube, den schwach Farben annehmenden Kopf und das Mittelstück mit dem Schwanze, welch letztere sich ebenfalls intensiv färben.

Wurde ein Samenfaden eines Meerschweinchens der Einwirkung des betreffenden Desmon ausgesetzt, so gewinnt derselbe folgende Eigentümlichkeiten: Die Haube büßt ihre Affinität zum Farbstoffe ein; der Kopf dagegen färbt sich stark (man erhält gleichsam das negative Bild der normalen Teile); das Mittelstück und der Schwanz behalten augenscheinlich ihr normales Verhalten zum Farbstoffe bei, doch werden sie dünner und kürzer.

Das Alexin ruft, für sich allein genommen, keinerlei sichtbare Veränderungen in der Struktur der Spermatozoen hervor. Wurde jedoch vor dem Alexin oder gleichzeitig mit demselben der Samenfaden der Einwirkung des Desmon unterworfen, so erhält man nach der nötigen Bearbeitung und Färbung folgendes Bild: Die Haube ist geschwunden, Kopf, Mittelstück und Schwanz sind gleichmäßig blaß gefärbt, der letztere erscheint gestreckt.

Das Gesagte bezieht sich auf die Wirkung der heterospermolytischen Elemente. Die Wirkung des Auto- und, was dasselbe ist, Isospermolysins beschränkt sich hauptsächlich auf Veränderungen der normalen Konfiguration der Haube und des Kopfes und Einrollen des Schwanzes zu einer Schleife. Besondere Versuche haben ergeben, daß dieses Einrollen des Schwanzes durch das Alexin und nicht durch das Desmon bewirkt wird.

Von der Anwendung des Spermolysins zu praktischen Zwecken zu reden, wäre verfrüht. Wir wollen nur bemerken, daß die Versuche dafür sprechen, daß eine an männlichen Mäusen ausgeführte Spermolysininjektion dieselben wenigstens für einige Zeit der Befruchtungsfähigkeit beraubt.

Die übrigen Gattungen von Cytolysinen sind noch verhältnismäßig wenig erforscht, und unsere Aufgabe wird erschöpft sein, wenn wir die allgemeinen Schilderungen derselben gebracht haben.

Zum Ausgangspunkte der Lehre von den Cytolysinen dienten die Bakteriolysine; sobald jedoch die ersten Mitteilungen über Hämolysine kund wurden, mußten die Bakteriolysine in den Hintergrund treten. Sie wurden aber dorthin zurückgedrängt, nicht um sie der Vergessenheit anheimfallen zu lassen, sondern im Gegenteil, um sie bei den cytolytischen Forschungen allzeit im Auge zu behalten. Die Bakterien sind wegen ihrer bedeutenden Kleinheit, der undeutlichen Kompliziertheit ihrer Struktur und noch deshalb, weil ihre elementaren biologischen Vorgänge der unmittelbaren Beobachtung nicht zugänglich sind, ein

äußerst undankbares Objekt zum Studium der cytolytischen Prozesse. Das Studium der Bakteriolyse wird durch das Studium der übrigen Gattungen von Cytolyse gefördert. Indem wir die Hämolysine, Spermolysine und dergleichen Cytolysine erforschen, interessieren wir uns natürlich zwar auch für deren selbständige Bedeutung, übertragen aber doch die gefundenen Thatsachen auf die Bakteriolysine, denn diese bilden den Mittelpunkt der cytolytischen Forschung, welche dereinst in das Wesen der natürlichen und künstlichen Immunität Licht hineinbringen soll.

Am ausgiebigsten erforscht sind die Cholerolysine, deren Eigenschaften wir unter anderem bei der Abfassung unserer Schilderung der Cytolysine überhaupt als Material benutzt haben.

Wir wollen bei dieser Gelegenheit die Anwendung erwähnen, welche man in der letzten Zeit von der Lehre über die Bakteriolysine für die parasitologischen Forschungen gemacht hat. Aus dem Umstande, daß Krebskranke keine spezifischen Lysine gegen die Bakterienformen aufweisen, denen man die Entstehung des Krebses zuschreiben wollte, zog man den Schluß, daß diese Bakterien an der Aetiologie der genannten Neubildung unbeteiligt sind. Die Angaben, daß das Serum Krebskranker, denen anticarcinomatöses Serum injiziert worden ist, blastomycetocide Fähigkeiten äußere, bedürfen noch der Bestätigung.

(Schluß folgt.)

Weitere Untersuchungen über spezifische Niederschläge.

[Aus dem staatl. serotherapeutischen Institute in Wien. Vorstand: Prof. R. Paltauf.]

Von

Privatdocent Dr. **R. Kraus**, Assistent am Institute und Dr. **Cl. Freiherr von Pirquet**, Sekundararzt am St. Annen-Kinderspitale.

I. Können Bakterienfiltrate agglutinierende Substanz binden [1])?

Der eine von uns zeigte in seiner Arbeit „über spezifische Niederschläge“ (Wien. klin. Wochenschr. 1897), daß die spezifisch fällbaren Substanzen dem Bakterienleibe angehören. In einer weiteren Arbeit nahmen wir an (Wien. klin. Wochenschr. 1898), daß die Substanzen in Bakterienfiltraten mit den agglutinierbaren Substanzen der Bakterien identisch sein dürften. Durch die Untersuchungen von Bail und E. P. Pick ist später gezeigt worden, daß die von uns in Bakterienfiltraten nachgewiesenen spezifisch fällbaren Substanzen, präzipitierbare Substanzen sui generis seien.

Auf Grund der folgenden Untersuchungen ergiebt sich aber, daß in den Filtraten neben präzipitierbaren Substanzen noch Körper vorhanden sind, die eine spezifische Bindungsfähigkeit für die Bakterien agglutinierende Substanz besitzen.

Radziewsky (1) beschäftigt sich als Erster mit der Frage, ob Bakterienfiltrate die agglutinierende Substanz zu binden imstande wären.

---

1) Ueber diese Versuche wurde in der Sitzung der morphologisch-physiologischen Gesellschaft in Wien am 5. März 1901 berichtet.

Veranlassung, dieser Frage nachzugehen, gab Radziewsky, der von Paltauf, Nicolle und uns vertretene Standpunkt über den Mechanismus der Agglutination, wonach der Agglutinationsprozeß mit der Entstehung spezifischer Niederschläge im engen Zusammenhange stehen dürfte.

„Gelänge es, nachzuweisen", sagt Radziewsky, „daß bei der Bildung der Bodensätze eine agglutinierende Substanz des Serums thätig ist, so wäre dadurch eine Stütze für die Annahme von Kraus und Nicolle gewonnen."

Radziewsky versucht auf folgende Weise die Identität der agglutinierbaren Substanz in den Filtraten mit der agglutinierbaren der Bakterien zu erbringen.

„Zur Erlangung eines Bodensatzes", heißt es in der Arbeit von Radziewsky, „setzen wir zu einer bestimmten Menge des Filtrates einer alten Kultur von Bact. coli eine gewisse, nicht große Quantität des entsprechenden spezifischen Serums zu. Ist nun einmal ein Bodensatz erschienen und die vollkommene Klärung der Flüssigkeitsschichten über ihm eingetreten, so muß, falls die Annahme von Nicolle und Kraus richtig ist, das Serum, das sich im klaren Teile der Flüssigkeit in Lösung befindet, entweder ganz seine Agglutinationseigenschaften verlieren oder sie müssen wenigstens in ihrer Intensität geschwächt werden. Zum Filtrate einer 5 Wochen alten Peptonbouillonkultur von B. coli 27 wurde Serum 27 im Verhältnis von 1 : 10 zugesetzt. Nach 24 Stunden hatte sich im Filtrate ein üppiger Bodensatz gebildet und die Flüssigkeit darüber war vollständig klar. Von dieser Flüssigkeit wurde eine bestimmte, nicht große Quantität gewonnen und teils unbestimmte, teils in mittels physiologischer Kochsalzlösung hergestellten Verdünnungen zu frischen Bouillonkulturen B. coli 27 zugesetzt und zwar in solchen Verhältnissen, daß das aus denselben Schichten entnommene Serum in Verdünnungen von 1 : 10, 1 : 50 u. s. w. bis 1 : 10000 verteilt wurde. Zugleich wurde zu der Kultur B. coli 27 in demselben Verhältnis ein Immunserum No. 27 zugesetzt, das zur Erlangung eines Bodensatzes noch nicht gebraucht worden war.

Das Resultat war folgendes: In den Röhren, die Serum 27 in Verdünnungen von 1 : 1000, 1 : 5000, 1 : 10000 enthielten, war nach 2 Stunden eine deutliche Agglutination eingetreten, in den Röhren hingegen, die das aus dem Filtrate entnommene Serum enthielten, war nur in der Röhre mit einer Serumverdünnung von 1 : 1000 eine deutliche Agglutination sichtbar, während in den anderen Röhrchen nichts Derartiges bemerkt werden konnte. Eine Stunde darauf jedoch trat auch in diesen Röhren eine Agglutination ein, wobei zu bemerken ist, daß auch einige Stunden später in letztgenannten Röhrchen die stattgefundene Agglutination sich nicht in so ausgesprochener Weise dokumentierte, wie in den Röhrchen mit reinem Serum. Daraus folgt also, sagt Radziewsky weiter, daß die Agglutinationseigenschaften des Serums bei diesen Versuchen in ihrer Agglutinationskraft nicht geschädigt werden, trotzdem dieses Serum im Filtrate des Bacterium coli zur Entstehung eines üppigen Bodensatzes Anlaß gegeben hatte. Wir sehen also aus diesem Versuche, daß kein Grund vorliegt, anzunehmen, daß die Bildung der Bodensätze auf Kosten der Agglutinationssubstanzen der Sera geschieht. Das Vermögen, Bodensätze zu bilden, stellt sich als eine ebensolche weitere selbständige Eigenschaft des Immunserums dar, wie ihre agglutinierenden und baktericiden Eigenschaften."

Wenn dieser Versuch von Radziewsky ganz exakt ausgeführt worden wäre, könnte es keinem Zweifel unterliegen, daß die aus seinen Versuchen gezogenen Schlußfolgerungen anerkannt werden müßten.

Aus dem Folgenden wird sich aber ergeben, daß dem sonst folgerichtig gedachten Bindungsversuche Radziewsky's Fehler anhaften.

Die Versuche von Radziewsky sind deswegen nicht beweisend, weil den quantitativen Verhältnissen, deren Berücksichtigung nach Ehrlich beim Studium der Bindungsverhältnisse nicht außer Acht gelassen werden darf, zu wenig Rechnung getragen wurde.

In unseren Versuchen haben wir die quantitativen Verhältnisse berücksichtigt und konnten nur auf diese Weise die von Radziewsky gestellte Forderung erfüllen.

(Die Versuche wurden so durchgeführt, daß zu Filtraten [durch Pukalfilter aus Bouillonkultur oder aus Kochsalzagarextrakten gewonnen] spezifisches agglutinierendes Serum zugesetzt wurde. Nach 24 Stunden wurde von der Flüssigkeit ein Teil weggenommen und bei Berücksichtigung der bereits erfolgten Serumverdünnung [durch das Filtrat] die bekannten agglutinierenden wirksamen Werte in Serumverdünnungen zu homologen Kulturen zugesetzt. Als vollständige Agglutination galten uns Proben, in denen ein Bodensatz entstanden war, über dem die Flüssigkeit vollständig klar war. Partielle Agglutination nennen wir diejenige Agglutination, bei der neben Bodensatz die darüber stehende Flüssigkeit nicht vollständig klar ist. Zu jedem Versuche wurden gleichzeitig Kontrollen mit den gleichwertigen Serumverdünnungen des reinen Serums angestellt. Zusammengehörige Versuche wurden stets mit demselben Filtrate und demselben Serum ausgeführt.)

Ein orientierender Versuch überzeugte uns, daß auf die quantitativen Verhältnisse, welche sowohl die Menge des genau ausgewerteten Serums als auch die Mengen und das Alter eines Filtrates berücksichtigen, genau geachtet werden muß.

1. Versuch.

(Verwendet wurde ein Bakterienfiltrat einer 1 Monat alten Typhusbouillonkultur und agglutinierendes Serum vom Pferde im Werte von 1 : 20 000.)

5 ccm Filtrat + 0,1 ccm Typhusserum	nach 2 Stunden mäßiger Niederschlag
5 „ „ + 0,2 „ „	
5 „ „ + 0,5 „ „	
5 „ „ + 1 „ „	sofortige Trübung, später Niederschlag

Wurden nach 24 Stunden von den einzelnen Proben 0,05 ccm klarer Flüssigkeit weggenommen und zu 2 ccm einer 24-stündigen Typhuskultur (Agarkultur aufgeschwemmt in physiologischer Kochsalzlösung) zugesetzt, so konnte in allen Röhrchen bereits nach 1 Stunde typische Agglutination nachgewiesen werden. Nur im Röhrchen von der Probe mit 0,1 ccm Serum war nach 1 Stunde keine ausgesprochene Agglutination. Während die Kontrollprobe vollständig agglutiniert war, sah man in diesem Röhrchen nur Flockenbildung.

Auf Grund des vorangehenden Versuches gehen wir im Folgenden genau auf die quantitativen Verhältnisse ein.

(Zu diesen Versuchen wurden Filtrate 6 Monate alter Typhusbouillonkulturen verwendet. Das agglutinierende Serum stammt vom Pferde und hat einen Agglutinationswert von 1 : 40 000.)

Versuche mit Filtraten aus Typhuskulturen.

Menge des Filtrates und des Serums	Resultat nach 24 Stunden	Davon in Verdünnungen geprüft	Resultat
5 ccm Filtrat 0,01 ccm Serum (1:500)	keine Trübung, kein Niederschlag	1:800 1:1200 1:3000	nach 2 Stunden Agglutination
		1:10000 1:20000	nach 2 Stunden partielle Agglutination, nach 4 St. Agglutinat. (Kontrolle: nach 1 Stunde typische Agglutination)
5 ccm Filtrat + 0,05 ccm Serum (1:100)	Trübung, kein Niederschlag	1:200	nach 2 Stunden Agglutin.
		1:300	nach 2 Stund. beginnende Agglutination
		1:3000	nach 2 Stunden keine Agglutination, nach 18 Std. partielle Agglutination
		1:5000	nach 3 Stunden keine Agglutination, nach 18 Std. partielle Agglutination
		1:10000 1:20000 1:40000	nach 18 Stunden keine Agglutination. (Kontrolle: in 1 Std. typische Agglutination.)
5 ccm Filtrat + 0,1 ccm Serum (1:50)	geringer Bodensatz	1:550	nach 2 Stunden partielle Agglutination
		1:6600 1:8000	nach 4 Stunden keine Agglutination, nach 18 Std. partielle Agglutination
		1:12000 1:18000	nach 18 Stunden keine Agglutination
5 ccm Filtrat + 0,2 ccm Serum (1:25)	flockiger Bodensatz	1:4000 1:5000	nach 3 Stunden Agglutination
		1:20000	nach 18 Stunden partielle Agglutination
5 ccm Filtrat + 0,5 ccm Serum (1:10)	mäßiger Bodensatz	1:20000	desgl.
5 ccm Filtrat + 1,0 ccm Serum (1:5)	Bodensatz	1:20000 1:30000	nach 3 Stunden Agglutination

Es ergiebt sich somit, daß nach Zusatz des agglutinierenden und präzipitierenden Serums zu den homologen Filtraten ein Verlust an agglutinierender Kraft des Serums zu verzeichnen ist. Dieser Verlust erfolgt nur bei einem bestimmten Verhältnisse des Serums zum Filtrate. Wenn auch keine vollständige Bindung gelungen ist, so konnten immerhin große Verluste (30000 agglutinierende Einheiten) an Agglutininen wahrgenommen werden. Da uns hier doch nur die Frage interessiert, ob agglutinierende Substanz überhaupt von homologen Filtraten gebunden wird, haben wir uns bloß mit der Feststellung der Thatsache beschäftigt und sind auf die weitere Frage nach den Bindungsgesetzen nicht näher eingegangen. Bemerkenswert wäre vielleicht auch die Erscheinung, daß die reichliche Präcipitation nicht kongruent mit dem Verluste an Agglutininen geht, indem bei 1 : 200 und 1 : 100 derselben Versuche eine leichte Trübung und großer Agglutinationsverlust, bei 1 : 25 bis 1 : 50 Bodensatz, aber höhere Agglutinationswerte sich vorfanden.

Diese Versuche zeigen schon in dieser Anordnung, daß die Bindung der agglutinierenden Substanz nicht durchweg nachweisbar ist und daß

die Bindung abhängig sein dürfte von einem bestimmten Mengenverhältnis der Filtrate zum Serum (der agglutinierbaren zur agglutinierenden Substanz). Dieselbe Menge Filtrat bindet z. B. bei 0,01 ccm überhaupt nichts von der agglutinierenden Substanz. Nach Zusatz von 0,2 ccm Serum ist der Verlust an agglutinierender Substanz geringer als bei 0,05 und 0,1 ccm Serum.

Eisenberg und Volk, die sich mit den Bindungsverhältnissen bei der Agglutination der Bakterien eingehend beschäftigt haben, gelang es nur durch successiven Zusatz an Agglutinin, eine vollkommene Absorption des Agglutinins zu erreichen.

Ein nicht näher angeführter Versuch zeigte uns, daß durch successiven Zusatz von Filtraten keine größeren Verluste an agglutinierender Substanz zu verzeichnen waren, als bei Zusatz der Filtrate auf einmal.

In Weiteren wollten wir erfahren, ob bei Verwendung desselben Filtrates und eines schwächer agglutinierenden Serums (1 : 2000) ebensolche Verluste an Agglutininen zu finden sein dürften, wie bei Verwendung von hochwertigen Agglutininen.

In den bisherigen Versuchen blieb die Menge der Filtrate konstant, die Serummenge wechselte. In den folgenden Versuchen wird bei gleichbleibender Serummenge die Menge des Filtrates erhöht.

Menge des Filtrates und des Serums	Resultat nach 24 Stunden	Davon in Verdünnungen mit Kultur	Resultat
5 ccm Filtrat + 0,1 ccm Serum (1:50)	geringer Bodensatz	1:1000 1:2500 1:20 000	nach 1 Stunde Agglutination (1:1000, 1:2500) nach 14 Stunden keine Agglutination
10 ccm Filtrat + 0,1 ccm Ser. (1:100)	desgl.	1:5000 1:10 000 1:20 000	nach 1 Stunde keine Agglutination, nach 4 Std. partielle Agglutinat. nach 14 Stunden keine Agglutination (1:10 000, 1:20 000)
15 ccm Filtrat + 0,1 ccm Ser. (1:150)	desgl.	1:3000 1:4500 1.12 000 1:15 000	desgl.
20 ccm Filtrat + 0,1 ccm Serum 1:200	kein Bodensatz	1:2000 1:4000 1:10 000	nach 18 Stunden keine Agglutination
5 ccm Filtrat + 0,2 ccm Serum 1:25	Bodensatz	1:5000 1:7000 1:12 500	nach 1 Stunde Agglutination
10 ccm Filtrat + 0,2 ccm Serum 1:50	desgl.	1:2500 1:10 000 1:20 000	desgl. nach 14 Std. Agglutination nach 14 Stunden partielle Agglutination
15 ccm Filtrat + 0,2 ccm Serum 1:75	desgl.	1:3000 1:12 000 1:15 000	desgl. nach 14 Stunden keine Agglutination (1:12 000, 1:15 000)

Wir sehen, daß die Wertigkeit des Serums nicht viel an den Bindungsverhältnissen ändert. Wir finden hier fast ebenso große Verluste an Agglutininen wie in den vorhergehenden Versuchen bei Anwendung eines hochwertigen Serums. Auch Eisenberg und Volk fanden, daß die Absorptionsverhältnisse verschiedenwertiger Typhussera auf Bakterien sich fast identisch gestalten, daß also ein Ein-

fluß der Wertigkeit des Serums auf die Größe der Absorption nicht bestehen dürfte. Außerdem lehren unsere Versuche, daß mit steigenden Mengen von Filtraten (agglutinierbare und präzipitierbare Substanz) bei gleichbleibenden Serummengen größere Verluste an Agglutinin nachweisbar sind. Nach Zusatz von 0,1 ccm zu 5 ccm Filtrat finden wir davon nach 1 Stunde Verdünnungen von 1 : 2500 agglutinierend wirksam. 15 und 20 ccm Filtrat bedingen viel größere Bindungen an Agglutinin, so daß die Verdünnungen davon 1 : 3000, 1 : 2000 selbst nach 18 Stunden keine Agglutination hervorzurufen imstande sind. Nach 0,2 ccm Serumzusatz zeigt sich in den früheren und in diesen Versuchen fast keine Abnahme an Agglutinin. Steigert man jedoch die Menge der Filtrate auf 10 und 15 ccm, so nimmt auch der Verlust an agglutinierender Substanz zu.

Aus dem Angeführten würden wir schließen, daß die Bindung der agglutinierenden Substanz des Serums von dem relativen Verhältnis der Filtrate (agglutinierbare und präzipitierbare Substanz) zu der Menge der Agglutinine abhängig sein dürfte. Eisenberg und Volk haben die Verhältnisse der Bindung bei steigender Menge der agglutinierbaren Substanz (Bakterien) einer näheren Prüfung unterzogen und konnten ebenfalls feststellen, daß mit Zunahme der Bakterien (agglutinierbare Substanz) zum agglutinierenden Serum eine Zunahme der Absorption von Agglutininen erfolgt. Die Absorption geht nach Eisenberg und Volk nicht in einfachen Proportionen vor sich, so etwa, daß eine doppelte Bakterienmenge 2mal soviel Agglutinin aufnehmen würde als die einfache, sondern daß einer relativ großen Vermehrung der Bakterienmenge nur eine geringe Steigerung der Absorption entspricht. Als Ergänzung und bessere Beleuchtung der vorangehenden Versuche mit Filtraten führen wir noch einige Versuche mit Bakterien an, die ähnliche Bindungsverhältnisse aufweisen. Mit zunehmender Menge Bakterien nimmt die Bindung an Agglutinin bei gleicher Serummenge zu.

Menge abgetöteter Typhusagaraufschw. und Serum	Resultat nach 24 Stunden	Davon in Verdünnungen mit Kultur	Resultat
5 ccm + 0,05 ccm Serum (1 : 100)	Agglutination	1 : 1000	nach 4 Std. Agglutination
		1 : 3000 1 : 10 000 1 : 20 000	nach 18 Stunden keine Agglutination
10 ccm + 0,05 ccm Serum (1 : 200)	desgl.	1 : 2000 1 : 4000	nach 24 Stunden keine Agglutination
5 ccm + 0,1 ccm Serum (1 : 50)	Agglutination	1 : 500	nach 3 Stunden partielle Agglutination
		1 : 1000	nach 18 Stunden partielle Agglutination
		1 : 2000 1 : 20 000	nach 18 Stunden keine Agglutination
10 ccm + 0,1 ccm Serum (1 : 100)	desgl.	1 : 1000 1 : 2000	nach 24 Stunden keine Agglutination

Gleiche Versuche wie mit Typhusfiltraten haben wir noch mit Cholerafiltraten angestellt. Die Cholerafiltrate (verschieden alt) waren teils aus Bouillonkulturen, teils aus Agarkulturen gewonnen. Das Serum stammte von Pferden und agglutinierte im Werte von 1 : 40 000 und 1 : 60 000.

Versuche mit Filtraten aus Cholerakulturen.

Menge der Filtrate und des Serums	Resultat nach 36 Stunden	Davon in Verdünnungen mit Kultur	Resultat
5 ccm Filt. + 0,1 ccm Ser., dann nach 24 St. 0,1 ccm Serum	Niederschlag	1 : 5000 1 : 7000 1 : 12 000	nach 18 Stunden keine Agglutination
10 ccm Filt. + 0,2 ccm Ser., dann nach 24 St. 0,1 ccm Serum	desgl.	1 : 2000 1 : 10 000	desgl.
15 ccm Filt. + 0,1 ccm Ser., dann nach 24 St. 0,1 ccm Serum	desgl.	1 : 3000 1 : 20 000	desgl.

Auch diese Versuche, modifiziert noch in der Weise, daß successive Serum zugesetzt wurde, ergaben, daß sich die agglutinierende Substanz des Serums durch Substanzen in Filtraten ebenso spezifisch binden läßt wie durch Substanzen, welche im Bakterienleibe selbst vorhanden sind.

Der Einfluß der Zeit und der Temperatur auf die Bindung der agglutinierenden Substanz wurde auch einer Prüfung unterzogen.

Versuch auf zeitlichen Eintritt der Bindung.

Menge des Filtrates und des Serums	nach 10 Min.	nach 60 Min.	nach 4 Stunden
	in Verdünnung 1 : 2000 in Kultur		
10 ccm Bouillon + 0,1 ccm Serum	Agglutination 1	Agglutination 1	Agglutination 1
10 ccm Typhusfiltrat + 0,1 ccm Choleraserum	Agglutination 1	Agglutination 1	Agglutination 1
10 ccm Choleraagarfiltrat + 0,1 ccm Choleraserum	Part. Agglutinat. 2	Part. Agglutinat. 2	Part. Agglutinat. 2
10 ccm Cholerabouillonfiltr. + 0,1 ccm Choleraserum	Agglutination 1	Agglutination 1	Part. Agglutinat. 2
Aufschwemmung einer 24-stünd. Choleraagarkultur	— 4	— 4	— 4

(Die Zahlen bedeuten die Klarheit der Röhrchen in Bezug auf die Kontrollaufschwemmung = 4.)

Es zeigt sich, daß bereits nach 4 Stunden deutliche Bindung nachweisbar ist; eine kleine Verzögerung in der Agglutination findet man in den Filtraten der Choleraagarkulturen bereits nach 10 und 60 Minuten.

Versuch über Einfluß von Zeit und Temperatur auf Bindung des Agglutinins.

Menge der Filtrate und des Serums	Temp.	nach 1 Tage	n. 2 Tg.	nach 3 Tagen	nach 5 Tagen	nach 6 Tagen
		in Verdünnungen 1 : 1000 in Kultur				
5 ccm Cholerabouillonfiltr. + 0,1 ccm Serum (1 : 10)	10°	Agglut.	Aggl.	Agglut.	Part. Agglut.	Part. Agglut.
	25°	Part. Agglut.	"	"	" "	" "
	35°	Agglut.	"	"	Agglut. (?)	Agglut. (?)
10 ccm Filtrat + 0,1 ccm Serum (1 : 100)	10°	Part. Agglut.	—	Part. Agglut.	Part. Agglut.	Keine Aggl.
	25°	" "	—	" "	" "	" "
	35°	" "	—	Agglut.	" "	" "

Menge des Filtrates und des Serums	Temperatur	nach 48 Stunden	nach 5 Tagen
		in Verdünnungen 1:1000 in Kultur	
10 ccm Choleraagarfiltrat + 0,1 ccm Serum	10°	Keine Agglutination	Keine Agglutination
	20°	„ „	„ „
	35°	„ „	„ „
10 ccm Cholerabouillon-filtrat + 0,1 ccm Serum	10°	Partielle „	Partielle „
	20°	„ „	„ „
	35°	„ „	„ „

Demnach scheint die Temperatur auf das Bindungsverhältnis keinen besonderen Einfluß auszuüben. Eine Thatsache, die Eisenberg und Volk bei ihren Untersuchungen gleichfalls konstatieren konnten.

In einem Versuche war der zeitliche Einfluß auf den Verlust an agglutinierender Substanz unverkennbar. Nach Zusatz von Choleraserum zum Cholerabouillonfiltrat konnte ein Ausbleiben der Agglutination in Verdünnungen 1 : 1000 erst nach 6 Tagen beobachtet werden. Die Beobachtungen nach 1—5 Tagen ergaben in denselben Verdünnungen unvollständige Agglutination. Es war demnach Bindung der agglutinierenden Substanz erst nach 6 Tagen eingetreten. Dieses Serum, welches in der Kontrolle noch 1 : 60000 agglutinierte, hat in der Verdünnung 1:1000 nicht mehr agglutinierend gewirkt.

Daß die Bindung relativ rasch erfolgen könne, zeigten wir im vorherigen Versuche, wonach schon nach 10 und 60 Minuten Verluste an agglutinierender Substanz zu verzeichnen waren. Daß dort, wo die Bindung in kurzer Zeit nicht erfolgt ist, bei längerer Einwirkung dieser Substanzen aufeinander Bindung zustandekommt, geht aus dem eben besprochenen Versuche hervor. Bei Bakterien konnten Eisenberg und Volk bereits nach 5 Minuten zu einer Zeit, wo die ersten wahrnehmbaren Flocken erscheinen, maximale Bindung nachweisen. —

Daß die Versuche von Radziewsky und auch solche, die Bail (2) und Pick (3) diesbezüglich angestellt haben, aus dem Grunde ein dem unsrigen widersprechendes Resultat geliefert haben, konnte nur darin liegen, daß die Verhältnisse zwischen Filtrat resp. Koagulinen nicht genug variiert wurden; auch in unseren Versuchen tritt nur bei einem gewissen Verhältnis zwischen Filtrat und Serum (in einem Versuche mit Typhusfiltrat bei 1 : 100, im anderen bei 1 : 200 eine beträchtliche Verminderung des Agglutinationswertes hervor, während bei einem Verhältnisse von 1 : 25 kaum ein Verlust zu bemerken ist).

Im Versuche von Pick (p. 72) scheint übrigens gleichzeitig dieselbe bisher noch nicht erklärte Steigerung des Agglutinationswertes eingetreten zu sein, die er vorher (p. 68) beschreibt.

Nach Radziewsky würde der positive Ausfall der Versuche als Stütze für diejenige Theorie über Agglutination, die in der Agglutination eine Fällung sieht, anzusehen sein.

Wir werden anderorts (4) die Theorie der Agglutination besprechen und werden diese Versuche dann daraufhin einer Besprechung unterziehen. Vorderhand schließen wir aus diesen Versuchen nur, daß in den Bakterienkulturfiltraten eine Substanz vorhanden sein muß, die die spezifisch agglutinierende Substanz bindet.

Nach unseren bisherigen Erfahrungen ist bloß die agglutinierbare Substanz der Typhusbakterien, der Choleravibrionen etc. imstande, spe-

zifisch die agglutinierende Substanz des Typhus- und Choleraimmunserums zu binden.

Versuche, die wir mit Herrn Dr. Bleier ausgeführt haben, sprechen ebenfalls für die Spezifität der Bindung, indem nur der zur Immunisierung verwendete Coli-Stamm 1 sein zugehöriges Serum zu binden vermag. Nach Zusatz desselben Serums zu anderen Coli-Stämmen wurde nach 24 Stunden in den Proben der volle Wert an Agglutininen nachgewiesen.

Wir glauben nicht zu weit zu gehen, wenn wir auf Grund der vorliegenden Versuche in den Filtraten eine spezifisch agglutinierbare Substanz annehmen, deren biologische Identität mit der agglutinierbaren Substanz der Bakterien durch diese Bindungsversuche erwiesen zu sein scheint. Außer dieser spezifischen Substanz sind in den Filtraten nach den Untersuchungen von Bail und Pick, wie bereits angeführt wurde, noch spezifisch präcipitierbare Substanzen sui generis vorhanden.

II. Ueber Präcipitoide.

a) Ueber Abbau der Präcipitine durch höhere Temperaturen.

Tschistowitch (4) zeigte, daß dem Serumpräcipitin nach Erwärmung auf 70° die Eigenschaft verloren gegangen ist, im Serum Niederschläge zu erzeugen. E. P. Pick fand das Gleiche für die Bakterienpräcipitine. Nach $^3/_4$-stündigem Erwärmen auf 58—60° geht dem präcipitierenden Typhusserum die Fähigkeit ab, in den homologen Filtraten Niederschläge zu erzeugen.

Diese Thatsache und die Untersuchungen von A. Joos (6) bildeten den Ausgangspunkt folgender Untersuchungen [1]).

A. Joos konnte nachweisen, daß bei Mangel an Salz die Ausfällung der Bakterien ausbleibt. Trotz Zusatzes eines spezifischen Serums kommt es also bei Salzmangel (im Serum und in den Kulturen) nicht zur Agglutination. Gleichzeitig wies Joos nach, daß wohl die Agglutination ausbleibt, nicht aber die Verbindung der agglutinierbaren Substanz mit der agglutinierenden. Durch Bindungsversuche konnte Joos sicher nachweisen, daß auch ohne Ausfällung eine Verbindung der aufeinander wirkenden Substanzen (agglutinierbare und agglutinierende) erfolgen könne.

In unseren Untersuchungen haben wir uns zunächst die Frage vorgelegt, ob das durch höhere Temperaturen seiner fällenden Eigenschaft beraubte Bakterienpräcipitin vollständig zerstört wäre oder ob nicht möglicherweise nur die fällende Eigenschaft dem Serum abhanden gekommen sei. Sowie in den Versuchen von Joos die Verbindung der wirksamen Substanzen erfolgt, ohne daß die Ausfällung zustandekommen muß, war auch hier die Möglichkeit vorhanden, daß bei den Präcipitinen bei Erhaltenbleiben der bindenden Eigenschaft durch Erwärmen die fällende Eigenschaft verloren gehen könnte.

Ein orientierender Versuch überzeugte uns gleich von der Richtigkeit unserer Annahme. Eine Typhusagarkultur (48-stündig) wird mit 30 ccm physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt und pukalisiert. Zu 5 ccm Filtrat wird 1 ccm eines bei 58° inaktivierten Typhusserums

1) Diese Versuche waren zum größten Teile im Sommer 1901 ausgeführt. Herr Prof. Paltauf hat bereits in der Diskussion zum Vortrage Gruber's einen Teil der Resultate „über Präcipitoide" mitgeteilt. (Sitzungsber. der Gesellschaft der Aerzte. Wiener klin. Wochenschr. 1901.)

zugesetzt. Nach 18 Stunden kein Niederschlag. Nach Zusatz 1 ccm aktiven Typhusserums ist nach 18 Stunden kein Niederschlag aufgetreten. In der Kontrollprobe typische Niederschläge.

Ein Versuch mit Bouillonkulturfiltraten fällt ganz gleich aus.

Dieser orientierende Versuch zeigt, daß durch Erwärmung auf 58° das Typhusserum seine fällende Eigenschaft verliert, daß es aber imstande sei, die Bildung von Niederschlägen nach Zusatz eines aktiven Präcipitins zu verhindern.

Pick konnte bei seinen Untersuchungen über spezifische Niederschläge, unabhängig von uns, dieselbe Thatsache feststellen und kommt auf Grund seiner Versuche zu dem Schlusse, daß durch Erwärmen im Typhusserum und im Choleraserum eine neue koagulinhemmende Substanz, unabhängig vom Koagulin (Präcipitin), entstehe.

Ausgehend von unserem eben angeführten Versuche, haben wir uns in den folgenden Versuchen mit dem Mechanismus der Hemmung der Niederschlagsbildung durch inaktiviertes Immunserum eingehender beschäftigt. Die folgenden Versuche wurden mit Cholerafiltraten aus Bouillonkultur gewonnen und mit Choleraserum (vom Pferde) ausgeführt.

I. Versuch.

a) 5 ccm Cholerafiltrat + 0,5 ccm inaktiviertes Choleraserum (bei 60°) — nach 10 Stunden bei 37° kein Niederschlag
nach 10 Stunden + 0,5 „ aktives „ (bei 60°) — nach 10 Stunden bei 37° kein Niederschlag

b) 5 ccm Cholerafiltrat + 1,0 „ inaktiviertes „ (bei 60°) — nach 10 Stunden kein Niederschlag
+ 1,0 „ aktives „ (bei 60°) — nach 10 Stunden kein Niederschlag

c) 5 ccm Cholerafiltrat + 0,5 „ inaktiviertes „ (bei 60°) — nach 10 Stunden kein Niederschlag
+ 1,0 „ aktives „ (bei 60°) — nach 10 Stunden kein Niederschlag

d) 5 ccm Cholerafiltrat + 0,5 „ aktives „ (bei 60°) — nach 10 Stunden typ. Niederschlag bei 37°

Aus dem Vorangehenden geht hervor, daß das Choleraserum, ebenso wie das Typhusserum, durch höhere Temperaturen seine fällende Eigenschaft einbüßt und daß gleichzeitig eine hemmende Eigenschaft sich geltend macht.

Der nächstfolgende Versuch beschäftigt sich mit der Frage, wie diese Hemmung der Niederschlagsbildung nach Zusatz eines aktiven Serums zu erklären wäre.

2. Versuch.

a) 5 ccm Cholerafiltrat + 0,5 ccm inaktiviertes Choleraserum — nach 10 Stunden kein Niederschlag
+ 0,5 „ aktives „ — nach 10 Stunden kein Niederschlag
+ 10 „ Cholerafiltrat — nach 10 Stunden typischer Niederschlag

b) 5 ccm Cholerafiltrat + 0,5 „ inaktiviertes Choleraserum — nach 10 Stunden kein Niederschlag
+ 10 „ Cholerafiltrat — nach 10 Stunden kein Niederschlag
+ 0,5 „ aktives Serum — nach 10 Stunden typischer Niederschlag

c) 15 ccm Cholerafiltrat + 1,0 „ inaktiviertes Serum — nach 10 Stunden kein Niederschlag
+ 1,0 „ aktives Serum — nach 10 Stunden typischer Niederschlag

Diese Versuche, in welchen nach Zusatz von Filtrat und inaktiviertem Serum nach neuerlichem Zusatze von aktivem Serum Niederschläge

erst dann entstanden sind, nur wenn Filtrat wieder zugesetzt wurde, lassen schon jetzt deutlich erkennen, daß *die Niederschlagshemmung bloß von dem Verhältnisse der Menge des inaktivierten Serums zur Menge der Filtrate abhängig sein dürfte.* Wurden beispielsweise im 2. Versuche 15 ccm Filtrat mit 1,0 ccm inaktiviertem Serum versetzt, so konnte ein neuerlicher Zusatz von aktivem Serum Niederschläge hervorrufen. Im 1. Versuche wurden nur 5 ccm Filtrat genommen, sonst dieselben Versuchsbedingungen eingehalten, ohne daß Niederschlag entstanden war. Auch die Versuche a) und b) sprechen dafür, *daß die Niederschlagshemmung mit der Menge der Filtrate zusammenhängen dürfte.*

Bevor wir daran gehen, die aus diesen Versuchen sich ergebenden Schlüsse zu formulieren, wollen wir noch zeigen, daß *die hemmende Substanz nicht auf das Präcipitin hemmend wirkt*, wie es *Pick* in seinen Versuchen annimmt.

3. Versuch.

a) 0,5 ccm inaktiv. Choleraserum	+ 0,5 ccm aktives Choleraserum	— 10 Stdn. bei 37°
	+ 5 „ Cholerafiltrat	— nach 10 Stunden bei 37° kein Niederschlag
	+ 10 „ „	— nach 10 Stunden typ. Niederschlag
b) 1,0 „ „ „	+ 1,0 „ aktives Choleraserum	— 10 Stdn. bei 37°
	+ 15 „ Cholerafiltrat	— nach 10 Stunden typ. Niederschlag
c) 1,0 „ „ „	+ 1,0 „ aktives Choleraserum	— 10 Stdn. bei 37°
	+ 10 „ Cholerafiltrat	— nach 10 Stunden kein Niederschlag

Es lehren diese Versuche, daß *die niederschlaghemmende Substanz nicht auf das Präcipitin einwirken könne*, da doch sonst in diesem Versuche kein Niederschlag hätte entstehen dürfen. Die hemmende Substanz hätte doch, nachdem sie 10 Stunden mit dem Präcipitin zusammen bei 37° gestanden war, die präcipitierende Substanz irgendwie beeinflussen müssen. Es zeigt uns dieser Versuch, gerade so wie der frühere Versuch, daß *die niederschlaghemmende Substanz nicht auf das Präcipitin einzuwirken vermag, sondern nur auf die präcipitierbare Substanz der Filtrate.* Unsere Versuche und auch die folgenden sprechen dafür, daß *die hemmende Substanz die präcipitierbare Substanz bindet und daß aus diesem Grunde ein Niederschlag nach Zusatz eines aktiven Serums nicht entsteht.*

Wenn wir die Versuchsbedingungen so wählen, daß das inaktive Serum die vorhandene Menge der präcipitierbaren Substanz vollständig bindet, so kann nach neuerlichem Zusatze eines aktiven Serums kein Niederschlag entstehen. Der Niederschlag kann erst wieder entstehen, wenn wir eine entsprechende Menge präcipitierbarer Substanz zusetzen, die von dem frei gebliebenen Präcipitin gefällt werden kann. Andererseits bekommt man nach Zusatz frischen Serums einen Niederschlag im Gemisch von Filtrat und inaktivem Serum, wenn mehr präcipitierbare Substanz genommen wird, als die inaktive präcipitierende zu binden imstande ist (siehe 2. Vers., c). Der Ueberschuß der nicht gebundenen, präcipitierbaren Substanz wird vom freien Präcipitin gefällt.

Um dem Einwande zu begegnen, daß etwa die Verdünnung als Ursache der Niederschlagshemmung nach Zusatz aktiven Serums zum Filtratserumgemisch anzusehen wäre, wie es *Pick* in seinen Versuchen annimmt, haben wir diesbezügliche Kontrollversuche angestellt. Diese

Versuche, in welchen statt Filtrat die entsprechende Menge Bouillon oder Kochsalzlösung zugesetzt wurde, haben ganz einwandsfrei erwiesen, daß wir in der Verdünnung die Ursache für das Nichtentstehen von Niederschlägen im Gemisch von Filtrat mit inaktiviertem Serum bei Zusatz aktiven Serums nicht zu suchen haben.

Alle Thatsachen drängen nunmehr dahin, nur eine Erklärung anzunehmen, daß nämlich das inaktivierte Serum seine fällende Eigenschaft bei 60° einbüßt und die bindende behält. Das Präcipitin muß nach dem Ausfall dieser Versuche so konstituiert sein, daß es aus einer fällenden und einer bindenden Gruppe besteht. Die fällende Gruppe ist die labile. Die bindende Gruppe ist thermostabil. Nachdem es uns bisher nicht gelingen wollte, das inaktivierte Präcipitin durch Komplemente zu reaktivieren, nehmen wir vorderhand eine Konstitution an, wie sie Ehrlich für die Toxine, Agglutinine annimmt, und fassen sie als Receptoren zweiter Ordnung auf.

Diese Untersuchungen waren der Ausgangspunkt für die Versuche von Eisenberg und Volk (7) über Agglutinoide. Eisenberg und Volk konnten die Konstitution, wie wir sie für die Bakterienpräcipitine eben aufgestellt haben, auch bei den Agglutininen nachweisen. Auch sie nehmen an, daß das Agglutinin aus zwei Gruppen besteht, aus einer fällenden und einer bindenden Gruppe. Die fällende Gruppe, die Trägerin der spezifischen Wirkung ist, ist auch sonst bei den Toxinen und Hämolysinen labil gegen äußere Einwirkungen, während die bindende sich als resistenter erweist.

Auch Bail findet die Agglutinine aus zwei Gruppen zusammengesetzt, glaubt aber auf Grund seiner Untersuchungen die Agglutinine als Receptoren dritter Ordnung ansehen zu müssen.

b) Ueber Abbau der Präcipitine.

Die folgenden Versuche bringen weitere Anhaltspunkte für die angenommene Konstitution der Präcipitine. Die Versuche wurden mit einem Choleraserum ausgeführt, welches durch Monate bei Zimmertemperatur aufbewahrt wurde. Zunächst wurde das Serum nach 7 Monaten geprüft.

1. Versuch.

5 ccm	Cholerafiltrat	+ 0,5 ccm	aktives altes Choleraserum	— nach 24 Stunden typischer Niederschlag
5 „	„	+ 1,0 „	„ „ „	— nach 24 Std. kein Niederschlag
5 „	„	+ 2,0 „	„ „ „	— desgl.
15 „	„	+ 1,0 „	„ „ „	— nach 24 Std. typ. Niederschlag
15 „	„	+ 2,0 „	„ „ „	— desgl.
20 „	„	+ 1,0 „	„ „ „	— desgl.
20 „	„	+ 2,0 „	„ „ „	— desgl.

Dieser Versuch zeigt zunächst die merkwürdige Erscheinung, daß geringere Mengen eines Serumpräcipitins Niederschläge zu erzeugen imstande sind, bei Zusatz größerer Mengen Präcipitin bleiben die Niederschläge aus.

Aendert man die Versuchsanordnung in der Weise, daß man eine große Menge der Filtrate nimmt, die Menge der Präcipitine gleich läßt, so treten dann in den Filtraten Niederschläge auf. Die Serummengen, die bei geringeren Filtratmengen sich als unwirksam erwiesen haben, erzeugen bei größeren Mengen Filtrat nunmehr typische Niederschläge. Eine Modifikation der eben ausgeführten Versuche bildet der Versuch:

5 ccm Cholerafiltrat + 1 ccm aktives altes Serum — nach 24 Stdn. kein Niederschlag
+ 10 „ Cholerafiltrat — typischer Niederschlag

Es war noch, bevor wir an die Erklärung dieser Thatsachen herantreten, zu entscheiden, ob ein frisches Immunserum auch dieses eigentümliche Verhalten zeigen würde. Es wurde deshalb dasselbe Filtrat mit ganz frischem Serum von demselben Pferde zum Versuche verwendet.

5 ccm Cholerafiltrat + 0,5 ccm frisches Serum } nach 24 Stunden typ. Niederschlag
+ 1,0 „ „ „ }
Kontrolle: 5 ccm Cholerafiltrat + 1,0 ccm altes Serum — nach 24 Stdn. kein Niederschlag

Weder in diesem Versuche noch in anderen konnten wir diese Erscheinung, die wir mit dem älteren Serum konstatieren konnten, nachweisen.

Wenn wir jetzt nach einer Erklärung für diese Thatsachen suchen, so finden wir dieselbe, wenn wir uns an die Konstitution des Präcipitins halten. Nach den vorhergehenden Versuchen ist das Präcipitin aus einer fällenden Gruppe, der labileren, und einer bindenden, der stabileren, zusammengesetzt. Bei den Agglutininen haben Eisenberg und Volk die verschiedensten Agentien einwirken lassen und fanden, daß die agglutinierende Komponente zerstört werde, die bindende bleibt unverändert. Auch in unseren Versuchen lassen sich mit der Annahme, daß die fällende Komponente des Serums im alten Serum langsam verloren geht und die bindende Gruppe des Präcipitinmoleküls erhalten bleibt, die Thatsachen erklären, wenn wir gleichzeitig noch eine Affinitätsänderung der bindenden Gruppe annehmen. Die bindende Gruppe des Präcipitins muß nach Wegfall der fällenden Gruppe, was übrigens auch aus den Versuchen mit inaktiviertem Serum hervorgeht, eine größere Affinität zur präcipitierbaren Substanz haben als das intakte restliche Präcipitin.

Wenden wir nun diese Vorstellung über das modifizierte Präcipitin auf unsere Versuche an, so läßt sich damit die Erscheinung, daß geringe Mengen eines Serums Niederschläge erzeugen und größere Serummengen nicht, leicht erklären. Die geringe Serummenge enthält so wenig abgebautes Präcipitin, daß die präcipitierbare Substanz in einer bestimmten Fitratmenge nicht vollständig gebunden wird. Es bleibt ein Ueberschuß präcipitierbarer Substanz, die vom nicht modifizierten Präcipitin gefällt wird. Setzen wir weiter zu derselben Filtratmenge eine größere Serummenge (1, 2 ccm) dieses modifizierten Serums, vermehren wir gleichzeitig die Menge der bindenden i. e. avideren Substanz. Diese besetzt nun vermöge ihrer größeren Affinität die präcipitierbare Substanz, so daß entweder diese vollständig besetzt ist oder ein so geringer Ueberschuß bleibt, daß das nicht modifizierte Präcipitin keine fällbare Substanz mehr zur Verfügung hat. Vermehren wir jetzt noch die Menge der fällbaren Substanz (größere Filtratmenge auf einmal oder nachträglicher Zusatz von Filtrat), so findet das freie, nicht modifizierte Präcipitin genügend präcipitierbare Substanz vor, so daß dann typische Niederschläge erzeugt werden können.

Wir sehen also, daß durch den Wegfall der fällenden Gruppe die bindende Gruppe des Präcipitinmoleküls, die wir mit Müller Präcipitoid nennen wollen, eine neue Eigenschaft der größeren Affinität zur präcipitierbaren Substanz erwirbt. Unter Präcipitoid würden wir also ein Präcipitin verstehen, welches seine fällende Eigenschaft

verloren hat, dem die bindende Eigenschaft erhalten blieb.

Ganz ähnliche Beobachtungen haben Eisenberg und Volk bei den Agglutininen gemacht, indem sie Agglutinationshemmung bei verschiedenen modifizierten Seris nachweisen konnten. Sie nehmen an, daß die hemmende Substanz eine Modifikation des Agglutinins sei, welche die fällende Eigenschaft eingebüßt hat, dagegen eine höhere Affinität zur agglutinierbaren Substanz besitzt als das restliche unveränderte Agglutinin.

P. Müller (8) kommt bei seinen vorläufig mitgeteilten Untersuchungen zu denselben Resultaten, indem er zeigt, daß das Laktoserum, das durch Milchzusatz seines Präcipitins beraubt wurde, auch durch Erhitzung auf 75° keine hemmenden Eigenschaften gewinnt. „Die hemmenden Substanzen scheinen nach Müller Derivate des Präcipitins zu sein und durch Erhitzung aus demselben zu entstehen." Das modifizierte Laktoserum, i. e. die bindende Gruppe, nennt Müller Präcipitoid.

Ob der von uns festgestellte Abbau des Präcipitins eine allgemeine Bedeutung für Präcipitine haben dürfte, soll durch weitere Untersuchungen in dieser Richtung klargestellt werden[1]).

Vielleicht ist die von Halban und Landsteiner (9) beobachtete Hemmung der Agglutination und Präcipitation mit normalem Serum ebenfalls durch den Abbau des normalen Agglutinins und Präcipitins zu erklären.

Das bereits im Abbau begriffene, geprüfte Choleraserum wurde nach weiteren 7 Monaten (14 Monate altes Serum) einer Prüfung unterzogen.

5 ccm Cholerafiltrat	+ 0,3 ccm Serum	nach 24 Stunden kein Niederschlag
5 „ „	+ 0,5 „ „	
5 „ „	+ 1,0 „ „	
5 „ „	+ 2,0 „ „	nach 24 Std. Niederschlag (nicht massig)
5 „ „	+ 3,0 „ „	
5 „ „	+ 4,0 „ „	

(Kontrolle: 5 ccm Cholerafiltrat + 0,5 ccm frisches Serum ergeben typ. Niederschläge.)

Während das Serum vor 7 Monaten das früher ausführlich besprochene paradoxe Verhalten gezeigt hat, in dem geringere Mengen davon wirksamer waren als größere Serummengen, finden wir jetzt die Menge, die seiner Zeit wirksam war, unwirksam, und erst größere Mengen wirken fällend.

Zur Erklärung dieser Aenderung in der Wirksamkeit desselben Serums nach verschiedener Zeit wären zwei Möglichkeiten heranzuziehen.

Zunächst wäre daran zu denken, daß der Abbau des Serums weiter gediehen sei, so daß die fällende Komponente bei 0,5 und 1 ccm nicht mehr nachweisbar sei. Wäre dem so, dann müßte wenigstens die resistentere, erhalten gebliebene bindende Gruppe zum Ausdruck kommen. Der Versuch widerspricht von vornherein dieser letzteren Annahme, da doch nach Zusatz von 2, 3 und 4 ccm Serum die Erscheinung der Niederschlagshemmung sich hätte zeigen müssen. Der folgende Versuch zeigt ebenfalls die Unmöglichkeit dieser Annahme.

5 ccm Cholerafiltrat + 0,5 ccm altes Serum — nach 24 Std. kein Niederschlag
dazu ferner + 1,0 „ frisches „ — nach 24 Std. typ. Niederschlag

1) Diese Untersuchung ist inzwischen, wie aus einem soeben erschienenen Referat in diesem Centralblatt hervorgeht, von Ph. Eisenberg (Krakau) zum großen Teil ausgeführt. Herr Dr. Eisenberg hatte während seines Aufenthaltes im Institute Gelegenheit, unsere Versuche zu verfolgen und hat dieselben in der gedachten Richtung ausgeführt.

Dieser Versuch würde eher dafür sprechen, daß nicht nur die fällende, sondern auch zum großen Teil die bindende Gruppe eines Teiles des präcipitierenden Serums mit der Zeit zerstört wurde. In 0,5 ccm ist weder fällende noch die entsprechende Menge bindender Substanz vorhanden, so daß die präcipitierbare Substanz des Filtrates nicht gebunden erscheint. Setzt man frisches Serum zu diesem Filtrat, entsteht natürlicherweise ein Niederschlag, da das Präcipitin präcipitierbare Substanz zur Verfügung hat.

Wir würden aus diesen Versuchen also schließen, daß der Abbau des Präcipitins durch Stehenlassen (äußere Einflüsse) successive erfolgen könne, indem dem Serum zunächst die fällende Gruppe verloren geht, später auch die bindende. Zum Ausdruck gelangt dieser Abbau zunächst durch die Erscheinung der Niederschlagshemmung, wenn die fällende Gruppe eines sich zersetzenden Serums verloren gegangen war. Ist auch die bindende Gruppe zerstört, so findet man bloß ein Zurückgehen des Gesamtwertes, indem nunmehr erst größere Serummengen fällend wirken.

Dieser spontane Abbau der Präcipitine schließt sich der von Ehrlich beschriebenen Umwandlung der Toxine in Toxoide an.

Litteratur.

1) Radziewsky, Zeitschr. f. Hygiene. Bd. XXXIV.
2) Bail, Archiv f. Hygiene. 1902.
3) Pick, E. P., Hofmeister's Beiträge z. physiol. Chemie. 1901.
4) Kraus, Zeitschr. f. Heilkunde. 1902.
5) Tschistowitch, Annal. de l'Inst. Pasteur. 1899.
6) Joos, A., Zeitschr. f. Hyg. 1901.
7) Eisenberg und Volk, Zeitschr. f. Hyg. 1902.
8) Müller, P., Münchener med. Wochenschr. 1902. [Vorläufige Mitteilung.]
9) Halban und Landsteiner, Münchener med. Wochenschr. 1902.

Concerning an improved method of making collodium sacs.

[From the Pathological Laboratory of the Johns Hopkins University and Hospital.]

By **Norman MacLeod Harris**, M. B.,
Associate in Bacteriology, Johns Hopkins University, Baltimore, Md., U. S. A.

With 3 Figures.

It will not be too presumptuous upon my part to state that by the majority of workers in our bacteriological laboratories both the utilization and the making of the collodium, or celloidin sac for experimental purposes is almost wholly neglected. This is largely to be accounted for, perhaps, either by the lack of a fully described technique of a reasonably easy method, or by the presentation of a too cumbersome method which entails spending too much time in overcoming many difficulties of a technical nature, thus naturally leading to discouragement and the abandonment of further attempts. It is, therefore, the object of this paper to present an improved method of making these sacs, the technique of which is simple and readily acquired, whilst the materials are practically always at hand in every laboratory for making them upon briefest notice.

Before entering upon details it may not, perhaps, be out of place to give a short review of the history connected with the introduction of collodion sacs and the several methods employed in their manufacture, as far as I have been able to get at the facts.

Taking advantage of the facilities for osmosis afforded by collodium films, the idea of sealing up bacteria in the living state within such films and placing them within the animal body to obtain, if possible, the effects of the elaborated diffusible toxins without the presence of the germs themselves in the blood or tissues, presented itself some six or seven years ago to Drs. Metschnikoff and Roux of the Pasteur Institute in Paris. This idea was successfully wrougth out by them in their studies upon the toxin of Asiatic cholera in 1896, and later, by Nocard and Roux who by this means undoubtedly isolated the causative factor of pleuropneumonia of cattle. This latter study was a veritable triumph, inasmuch as it proved what had heretofore been only suspected, that in certain infectious diseases we hat to deal with living matter of such minute proportions as to be beyond the ability of the most powerful microscope to define.

Furthermore, Nocard was able by means of the sacs to transform the characteristics of the human tubercle bacillus into those of the avian variety, thus adding proof to the theory of the mutability of closely allied forms of bacteria.

It was also demonstrated that the virulence of pathogenic bacteria could in some instances be highly exalted by implanting a successive series of collodium sac cultures in the peritoneal cavities of animals.

Quite recently, McCrae has pointed out the value of the sac in the classification of bacteria of closely allied species, and has produced agglutinative reactions in the blood of one animal inoculated with sacs, each containing a different species of bacterium.

In perusing the writings of Metschnikoff, Roux and Nocard relative to their experimentations with collodium sacs, one curiously enough fails to glean the least hint as to how these sacs were prepared, nor do later publications from the Pasteur Institute seem to contain any references to the technique.

In this country some years ago, (1898?), partially successful attempts were made by Dr. E. L. Trudeau of Saranac Lake to tourn out a serviceable celloidin sac. He was, I believe, the first to suggest the employment of the ordinary gelatin capsule as a mold upon which to form the sac. The method used was found not to be sufficiently well developed to yield satisfactory results and publication was never made, although Dr. Trudeau openly spoke of his technique to many.

Dr. T. M. Prudden of Columbia University, about the same time developed a method of making celloidin sacs by using a tube in whose bottom a small hole was blown, which previous to dipping was sealed by a thin film of celloidin. The tube was dipped in the medium and rolled until it had set, when the sac was dislodged by blowing into the tube, the air escaping from the small hole in the bottom and dissecting the film away from the sides of the tube. The method did not prove very satisfactory, nor did the coating of gelatin capsules in several ways yield any better results.

To Professor F. G. Novy of the University of Michigan belongs the credit of being the first to publish the method of Metschnikoff and Roux. This consists, briefly, in coating a glass rod of a certain

thickness with collodion, several times, until a sufficiently thick layer is deposited, allowing it to set and then peeling the sac off by inversion, trimming it and affixing a piece of glass-tubing of proper calibre by the aid of gentle heat. By further manipulation the capsule is filled with broth, sterilized, inoculated and the tube sealed up close to the capsule by means of the gas flame.

Utilizing Trudeau's idea of employing the gelatin capsule as a mold. Dr. John McCrae of Montreal has devised a most successful method. His technique is briefly stated as follows the larger end of a selected gelatin capsule is made to adhere to the end of a piece of glass tubing of similar bore, by heating the latter a little. The capsule is then dipped in thin celloidin several times until a sufficient coating has formed, when it is further hardened by immersing in cold water. The gelatin is next dissolved away by hot water, the resulting celloidin sac filled with broth, sterilized and preserved in a broth culture tube for use when desired.

Quite recently Dr. C. S. Gorsline of the University of Michigan has published a method which is essentially that of Prudden but he has overcome difficulties of dislodging the sac from the glass tube by filling the latter with water and forcing the water out through the hole by blowing into the tube. The sac is then fitted to a suitable piece of glass tubing by gently heating the latter, and the final technique is that of filling with broth and sterilizing under conditions suitable for preserving the capsule from contamination until required for implantation.

Regarding the method which I have devised, I can make few claims to any originality, having built upon Dr. Trudeau's idea of using the gelatin capsule, and benefitted als by McGrae's efforts in the same line.

The procedure is carried out as follows, having first assembled the necessary materials consisting of

a) Empty gelatin capsules: those of Parke, Davis & Co., may be had in the market, of almost any size desired, ranging from "No. 0 — medical", holding about 1 ccm, up to "No. 10 — veterinary", holding approximately 30 ccm.

b) Glass tubing: — preferably that having a gross diameter of from 2,5 mm to 4 mm, or if such sizes are not at hand, coarser tubing may be drawn out to suit the purpose.

c) Collodium (U. S. P.), or celloidin: — either solution to be tolerably thick and kept in a small round jar, with closely fitting top, to the depth of 4—5 cm.

d) A Drying-rack made by piercing a half inch pine board with rows of long fine wire-nails at intervals of 4 cm.

e) A glass-blower's burner, or some device to secure a long narrow flame.

f) A small file.

Procedure: — Having selected the gelatin capsule, a piece of glass tubing 4 cm long and of 3 mm diameter is taken and the sharp edge of one end is filed down and that end heated a moment in the flame of a Bunsen burner, then the unseparated capsule is taken in the grasp of the left thumb and fore-finger, and with those of the right hand gentle pressure is made with the heated end of the tube directly against the center of the end of the smaller portion of the capsule until the tube projects within the cavity not more than 2 mm (see Fig. 2).

In a moment it becomes fast, if the heat has not been so great as to burn the gelatin, then one proceeds to apply a coating of collodion by means of a match or platinum loop around the junction point of tube and capsule. Now separate the capsule, and by means of a knife or other sharp pointed tool clear the bore of the tube of the hardened cap of gelatin, then replace the two sections as before.

We now have the gelatin capsule centrally fixed to a permanent spindle which renders the coating with collodion or celloidin an easy matter. Before proceeding, however, to the coating process see that the collodion previously applied to the neck is quite dry. This being so, the jar containing the collodion is held tilted at an angle of about 50°, the gelatin capsule is slowly lowered into it and submerged sufficiently to coat the tube to the height of 1 cm above the end of the capsule. It is now brought slowly up out of the collodium in the horizontal position, quietly rotating it at the same time, care being taken

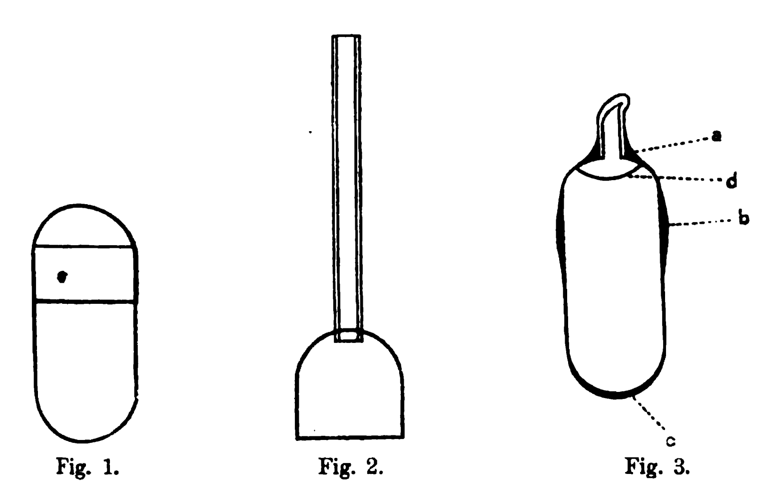


Fig. 1. Fig. 2. Fig. 3.

not to remove too much collodium else the smoothness and eveness of the film will be interfered with.

Now rotate continuously until it becomes set, slowly at first to ensure an even distribution of the material, then more rapidly, blowing upon it occasionally to hasten the setting. I do not believe that immersing the capsule in water at this stage tends to any advantage, rather the reverse, for opacities are liable to develope in the film which may become permanent and spoil the transparency of the finished sac, and may be, prevent proper dialysation. When the film has set, the capsule may be placed at once upon one of the nails of the drying-rack to dry. It is of especial importance to let it dry out thoroughly. After this process is ended it is not necessary to repeat the coating unless the collodion is quite thin (I might say, here, that before using, I allow it to evaporate down to the consistence of a moderately thick syrup), for the thicker the film the less useful a sac becomes; however, after a trial or two each worker can use his own judgment as to what is enough. It is necessary at this stage to reinforce the sac at certain points, but before doing this it may be well to wind a piece of silk thread on the glass tube close to the capsule tie it and leave two ends

hanging so that the sac later on may be readily handled. Referring to Fig. 3, a, b, c, the points to be reinforced are indicated and the measure is carried out by means of the platinum loop, except in reinforcing the end, which is accomplished by simply dipping the capsule again into the collodium. The sac is again placed upon the rack to dry, which occupies a short time, and it is then ready for the next step. In this way ten or twelve capsules may be set up in succession, and usually by the time the last one is coated the first will be found ready to be reinforced, and upon strengthening the last sac the first will be ready for finishing.

The gelatin must now be removed from the interior of the formed sac. This may go hand in hand with the sterilization, or constitute a separate procedure. Considering the former proposal first, the coated capsule is removed from the rack and filled with broth by means of a Pasteur pipette, conveniently bent at right angles a little distance above the bulb, and at once placed in a broth culture tube, glass spindle downwards, and covered with broth to the extent of 1—2 cm above the capsular end. The tube now holding the sac is autoclaved for five minutes at one atmosphere pressure and 120° C, thus rendering it completely sterile. It will be found upon removal from the autoclave that the gelatin has been melted and expelled from the sac and has gone into solution with the broth, so that we have now the sac filled with a medium of weak nutrient gelatin, which may congeal on cooling, constituting an excellent pabulum for bacteria.

If, however, it is thought to be desirable to remove the gelatin from the sac, the latter is to be filled as before, placed in a dish of hot water, when after a while the gelatin melts and may be washed out by means of the pipette, the process being repeated as often as is necessary. The sacs are then to be sterilized in the manner stated in the foregoing, and may be preserved in good condition for use at any time by leaving them in the culture tubes.

By the foregoing processes it will be found that very little, or no shrinking occurs in the sac if pains have been taken to dry it in the air after coating, and if the manipulations in coating have been deliberate, no bubbles should be seen in the walls of the sac. Likewise, the glass spindle remains firmle fixed in position, requiring considerable rough handling to cause its separation. It is surprising how tough such a sac can be after only one application of the thick collodion, and at the same time appear so frail.

As Novy points out, some varieties of collodium and celloidin are of little value for the manufacture of sacs on account of having such a low index of dialytic power, or are even without any, so it would be well to make a test of the osmotic properties of a sac before making a number of them [1]). This test can best be made by completely removing the gelatin and filling the sac with a saturated solution of magnesium sulphate, immersing it in distilled water and testing the latter for the presence of the salt at intervals.

The technique of inoculating and closing the sac will now be discussed. The culture tube containing the sterilized capsule is to

---

1) I am, however, inclined to believe that the condition is more often caused by the water-sardening process, or by having too thick a film, than in the quality of the material.

emptied of its fluid contents and the sac to be then deposited in a sterile Petri dish, or some other suitable vessel. With a pair of sterile dissecting forceps the glass spindle will be taken hold of and the sac held vertically upwards, whilst with a Pasteur pipette a small quantity of the contents is removed (see Fig. 3 d) so as to obviate any chance of the fluid within flowing up into the tube during the sealing of the glass, then with the pipette a small portion of the inoculating material is very carefully deposited within the capsule, caution being needed not to permit any to touch the sides of the tube.

The sealing of the glass tube demands most delicate manipulation upon the part of the operator. Having prepared the glass-blower's burner, the spindle of the sac is taken hold of high up with another pair of sterilized forceps, and with the first pair (heated a little to disperse moisture from inside the tube near the site of sealing) a fresh grasp is to be taken lower down close to the junction of the sac and the tube, then with the sac held vertically the glass tube is brought into contact with the narrow non-luminous flame of the burner a short distance above the lowermost forceps, precautions being taken to first drive off any moisture which might be lodging at or near the point of sealing, the glass rapidly fuses and is drawn apart gently and the end attached to the sac sealed perfectly, as shown in Fig. 3. Care must still be exercised until the glass point is well cooled, lest any agitation of the sac cause its contents to be thrown up into contact with the glass and crack it and render the sac useless. This danger being past, it is well to wash the sac off with sterile water or broth and replace it in a sterile broth culture tube until abdominal section has been performed upon the animal, when it is removed and cautiously inserted and gently pushed away from the site of the incision by the sterile finger of the operator. McCrae very wisely suggests that at first the operator should incubate the inoculated sacs for 24 hours in broth to assure himself that there is no flaw in his technique of making the sac, and if the broth remains sterile then to proceed to insert the capsule in the animal; this procedure may be abandoned if it is seen that one has acquired the technique perfectly.

Resume of technique:

a) Preparation of the glass tubing.
b) Fixation of same to gelatin capsule by heat.
c) Coating of junction-point while warm.
d) Clearing the bore of tube of gelatin.
e) Coating of the whole capsule.
f) Air-drying on the rack.
g) Reinforcing, and again drying.
h) Charging the capsule with broth.
i) Sterilization in autoclave (removal of gelatin).
j) Inoculation.
k) Sealing up glass tube.

Advantages of the Method:

1) There are practically no limitations to the size of the gelatin capsules requisite for experimentation.

2) There is no necessity to remove the sac from the mold, which is dissolved and forms a nutrient medium for the growth of the inculated organisms.

3) A greater relative amount of dislysing surface is obtained by

the use of a minimal quantity of glass, than is gotten by other methods.

4) By completely air-drying the collodium, a thinner, tougher, less shrunken and an equally good dialysing membrane is obtained than by the water-hardened, rod, or tube systems.

5) The method seems to throw fewer discouraging difficulties in the way of the operator than most of the other schemes.

That the method is not perfect will occur to all, but I offer it in the hope that it will afford some the opportunity of accomplishing with less difficulty what has heretofore been one of the most involved of bacteriological technical procedures, and also in the hope that it may finally lead someone to suggest a simpler and a more perfect method.

I take this opportunity to express my thanks to Doctors Trudeau, Prudden and Gorsline for information regarding their own technique.

Bibliography.

Metschnikoff, Roux et Salimbeni, Toxine et antitoxine cholérique. (Annal. de l'Inst. Pasteur. T. X. 1896. p. 257.

Nocard et Roux, Le microbe de la péripneumonie. (Annal. de l'Inst. Pasteur, T. XII. 1898. p. 240.)

Nocard, Sur les relations qui existent entre tuberculose humaine et la tuberculose aviaire. (Annal. de l'Inst. Pasteur. T. XII. 1898. p. 561.)

Trudeau, E. L., A personal communication (no publication of method).

Prudden, T. M., A personal communication (no publication of method).

Novy, F. G., Laboratory Work in Bacteriology. 2nd. edition. 1899. p. 496.

McCrae, J., Notes upon the agglutinations obtained by intraperitoneal insertion of celloidin capsules containing bacilli, and upon a mode of preparing such capsules. (Journ. of Experimental Medicine. Vol. V. 1901. p. 635.)

Gorsline, C. S., An improved method of making collodion sacks. (Science. 1902. Mar. 7th. p. 375.) — And in a personal communication.

Inhalt.

Originalmitteilungen.

Frommannsche Buchdruckerei (Hermann Pohle) in Jena.

CENTRALBLATT

für

Bakteriologie, Parasitenkunde und Infektionskrankheiten

Erste Abteilung:

Mediz.-hygien. Bakteriologie u. tier. Parasitenkunde

Originale

In Verbindung mit

Geh. Med.-Rat Prof. Dr. Loeffler, Prof. Dr. R. Pfeiffer, Prof. Dr. M. Braun
Greifswald Königsberg i. Pr.

herausgegeben von

Dr. O. Uhlworm in Berlin W., Schaperstr. 2/3 I

Verlag von Gustav Fischer in Jena

XXXII. Band. —— Jena, den 26. Juli 1902. —— **No. 2.**

Preis für den Band (50 Bogen) 15 Mark. Schwierige Tafeln werden einem Bogen gleich gerechnet. — Die Nummern erscheinen zwanglos je nach dem vorliegenden Stoffe. Bei Einzelverkauf Preis für einen einfachen Druckbogen 40 Pfg., für eine Tafel 60 Pfg.

Hierzu als regelmäſsige Beilage die Inhaltsübersichten der II. Abteilung des Centralblattes.

Die Redaktion des „Centralblatts für Bakteriologie und Parasitenkunde" richtet an die Herren Mitarbeiter die ergebene Bitte, etwaige Wünsche um Lieferung von besonderen Abdrücken ihrer Aufsätze entweder bei der Einsendung der Abhandlungen an die Redaktion auf das Manuskript schreiben zu wollen oder spätestens nach Empfang der ersten Korrekturabzüge direkt an den Verleger, Herrn Gustav Fischer in Jena, gelangen zu lassen.

Original-Mitteilungen.

Nachdruck verboten.

Die wichtigsten Methoden der Bakterienfärbung in ihrer Wirkung auf die Membran, den Protoplasten und die Einschlüsse der Bakterienzelle.

[Arbeit aus dem Botanischen Institute der Universität Marburg.]

Von **Arnold Grimme,**
Kreistierarzt in Melsungen (Hessen-Nassau).

Mit 2 Tafeln.

(Fortsetzung.)

Der Thimotheebacillus A. Moeller (Bacterium phleï).

Die Untersuchung dieses eigenartigen und wegen seiner Aehnlichkeit mit dem Tuberkelbacillus so überaus wichtigen Spaltpilzes wurde zunächst in der Absicht unternommen, den morphologischen Aufbau desselben,

soweit es mit den jetzigen optischen Hilfsmitteln und Reaktionen möglich ist, zu ergründen und das Verhalten der einzelnen Zellbestandteile den Farbstoffen gegenüber zu studieren. Wie oben schon erwähnt, war es ferner von Wert, auf die Beziehungen zwischen Säurefestigkeit dieses Bacillus und seinen morphologischen Eigentümlichkeiten näher einzugehen und einen Versuch zur Klärung des Wesens der Säurefestigkeit zu machen. Ich werde den letzteren Erwägungen ein späteres Kapitel widmen.

Die Originalkulturen des Thimotheebacillus, von denen ich ausging, verdanke ich der Liebenswürdigkeit des Herrn Dr. med. A. Moeller-Belzig, des Entdeckers dieser Species (A. Moeller 1898). Ferner habe ich eine Kultur, welche mit der Moeller'schen genau übereinstimmt, aus dem Král'schen Laboratorium in Prag bezogen.

Auf gleichem Nährsubstrat gezüchtet, gleichen die Bakterien beider Kulturen auch den in der Litteratur sich findenden Beschreibungen des Thimotheebacillus. Die Züchtung geschah auf 6-proz. Glycerinagar oder zuweilen auch auf normalem Dextroseagar im Brutschrank bei 28° C.

Ich wählte unter den säurefesten Bakterien gerade den Thimotheebacillus aus, weil dieser, wie schon erwähnt, eine große Aehnlichkeit mit dem Tuberkelbacillus besitzt.

Die morphologischen Eigenschaften des Thimotheebacillus sind nach A. Moeller (1899) folgende: „Er stellt ein schlankes, 1—4 μ langes und 0,2—0,4 μ breites, mitunter leicht gekrümmtes Stäbchen dar, das in seinem Innern zuweilen tiefer gefärbte Körner, zu anderen Malen auch ungefärbte ovale Stellen zeigt. Nicht selten bildet er an einem Ende keulenförmige Anschwellungen oder auch unter besonderen Bedingungen Verzweigungen. Alle diese Eigenschaften hat er mit dem Tuberkelbacillus gemein. Die ovalen, ungefärbt bleibenden Gebilde sind es, die seiner Zeit als Sporen des Tuberkelbacillus angesprochen wurden." Die Säurefestigkeit des Thimotheebacillus wird von mehreren Untersuchern übereinstimmend als eine besonders zähe bezeichnet. Petterson (1899) giebt sogar an, daß er mehr Säurefestigkeit besitze als der Tuberkelbacillus; ebendafür spricht auch die Beobachtung von E. Schütz (1900. p. 20), daß Thimotheebacillen aus 2 Monate alten Glycerinagarkulturen eine Einwirkung der Säure während mehr als 10 Minuten ertrugen, ohne sich völlig zu entfärben.

I. Untersuchung lebenden Materials.

Ungefärbt. Aus jüngeren Kulturen (Agar mit Dextrose) stammende Thimotheebacillen zeigen sich als verschiedenartig gestaltete Stäbchen, die bald gerade, bald gekrümmt sind, selten unregelmäßige Ausbuchtungen einer oder beider Längswände, häufiger dagegen kolbige und kugelige Anschwellung des einen, seltener beider Pole aufweisen (Fig. X *a*). Etwa vom 5. oder 6. Tage des Ueberimpfens ab gerechnet werden die Formen der Stäbchen gleichartiger und regelmäßiger. Die keuligen Anschwellungen werden seltener; gekrümmte Stäbe sind jedoch in allen Altersstadien häufig. In sehr jungen (1—2 Tage alten) Kulturen auf Glycerinagar sieht man ohne Zusatz eines Reagens hier und da vereinzelte Kugeln von ziemlich starker Lichtbrechung, welche besonders häufig an den Polen, seltener in der Mitte des Stäbchens liegen. In 4—5 Tage alten Kulturen nehmen dieselben an Zahl erheblich zu, auch zeigen sie schärfere Begrenzung gegen das Cytoplasma. Besonders häufig und meist größer sind sie in 10—20 Tage alten Glycerinagar-

kulturen zu finden. In noch älteren Kulturen verlieren diese Körper häufig ihre kugelige Gestalt, werden größer und zugleich mehr länglich, indem sie sich der Breite der Zellen anpassen. Sie treten in älteren Kulturen oft in solcher Masse auf, daß der übrige Protoplast auf kleine Abschnitte zusammengedrängt wird. Während in den ersten Tagen des Wachstums der Kultur eine Behandlung der Präparate mit Sudan III undeutliche Resultate lieferte, kann man bei zahlreicherem Auftreten und bei der oft erheblichen Größenzunahme jener lichtbrechenden Körper bald sehr deutlich eine helle Rotfärbung derselben in Sudan erkennen (Fetttropfen, Fig. X *c*). Zur zweifellosen Erkennung dieser Farbenreaktion gehört entweder ein von weißen Wolken zurückgestrahltes Licht oder das einer guten, mit Auerlicht versehenen Mikroskopierlampe. Am schärfsten sieht man die Farbe mit einem Apochromatobjektiv und besonders dann, wenn die Mikroskopierlampe statt mit Auerlicht mit Acetylenlicht versehen wird. Zur Beobachtung der Farbe ist ferner tiefe Einstellung bei völlig offener Blende notwendig. Vorteilhaft ist, die Sudanmischung vor der Beobachtung etwa 10 Minuten einwirken zu lassen. In Gelblösung färben sich die Kugeln ebenfalls, aber schwächer, und ist deshalb der Kontrast zum übrigen Zellleibe kein scharfer. In beiden Fettfarbstoffen färben sich jedoch nicht nur die kugeligen Einschlüsse, sondern auch die Membran. Diese wird aber so schwachrot in Sudan, daß nur dort, wo die Stäbchen in größeren Haufen liegen, eine hellrosa Farbe der ganzen Gruppe in die Erscheinung tritt.

Jodjodkaliumlösung *sch.* Die Stäbe nehmen eine hellgelbe Farbe an, die sich in konzentrierterer Lösung dementsprechend verstärkt. Die lichtbrechenden Kugeln (Fett) färben sich ebenfalls gelb und treten bedeutend schärfer hervor (Fig. X *b*).

Methylenblau *v.* Die Stäbchen jüngster Kulturen färben sich nur zum Teil kräftig; in ihnen ist hin und wieder an einem oder beiden Polen ein heller Fleck bemerkbar, der eine schwache Lichtbrechung besitzt. Andere färben sich sehr mattblau und weisen ebenfalls vereinzelte lichtbrechende Körper auf, die ganz weiß geblieben sind. Aelteres Material färbt sich in dieser verdünnten Farblösung sehr schwach oder zum Teil überhaupt nicht. Formolfuchsin färbt weder die jungen noch die alten Stäbchen.

II. Untersuchung fixierten Materials.

Methylenblau 1 + 10 (5 Minuten kalt) färbt etwa nur den dritten Teil aller Stäbchen, welche nur wenige Tage alt sind. Heller und dunkler gefärbte Abschnitte wechseln nicht selten miteinander ab (Fig. X *d* ², ³). Es bestehen keine scharfen Grenzen zwischen beiden. Dasselbe Material nimmt in erwärmter Methylenblaulösung (1 Minute) eine ziemlich gleichmäßige Färbung an, jedoch ist die Farbe noch matt und hell. In manchen Stäbchen sind ungefärbte Lücken zu sehen (bei hoher Einstellung dunkel, bei tiefer hell) (Fig. X *d*⁴). Sie sind entweder mittelständig oder liegen oft in den kolbigen Anschwellungen (Vakuolen). Durch Zusatz von Bismarckbraun 1 + 10 lassen sich keine blauschwarzen Kugeln in die Ercheinung bringen. 2 Tage altes, von gewöhnlichem Agar genommenes Material zeigt nach 5 Minuten langer Behandlung mit kalter Methylenblaulösung 1 + 10 keine oder ganz matte Färbung, nur einzelne Stäbchen färben sich völlig und kräftig. Stäbchen aus älteren Kulturen (8—10 Tage, Glycerinagar) färben sich in der Regel nur teilweise, und zwar besonders ihr mittlerer Abschnitt, während die

Pole ungefärbt bleiben. Bei der Färbung mit kalter Methylenblaulösung ist die Grenze zwischen gefärbtem und ungefärbtem Abschnitt eine scharfe (Fig. X d^5), bei der in erwärmter Farblösung dagegen ist sie unscharf und verschwommen (Fig. X d^6). Die hellen Abschnitte des Protoplasma, welche in der erwärmten Farblösung einen bläulichen Schimmer annehmen, zeigen in beiden Fällen eine deutliche Lichtbrechung (Fett). Die Membran scheint schwachblau gefärbt zu sein. In 20—30 Tage alten Kulturen sind, wie schon erwähnt, die Stäbe durchschnittlich länger und auch dicker und von einer Anzahl der oben beschriebenen, lichtbrechenden Körper, die zum Teil eine erhebliche Größe erreichen, durchsetzt. Mit Methylenblau färben sich diese Stäbe derart, daß innerhalb einer Zelle mehrere, in kalter Lösung schwächer, in erwärmter stärker gefärbte Abschnitte mit den auch hier ungefärbten, lichtbrechenden abwechseln (Cystoplasma und Fett). Eine Gegenfärbung mit Sudanlösung, oder in umgekehrter Reihenfolge zunächst Sudanfärbung und dann Methylenblau, bietet ein sehr klares Bild. Die lichtbrechenden Kugeln sind hellrot gefärbt, das Plasma blau (Fig. X c^5).

Fuchsinlösung (1 + 10, 5 Minuten kalt) färbt ebenfalls nur wenige Bacillen einer 3—5 Tage alten Kultur ziemlich kräftig rot; einzelne zeigen eine Rosafarbe, die meisten bleiben, vielleicht von einem mattrosa Schimmer abgesehen, ungefärbt (Fig. X e^1). In der erwärmten Farblösung nehmen alle Stäbchen eine ziemlich gleichmäßige, kräftig rote Färbung an. Auch hier sieht man nicht selten dunkler und hell gefärbte Stellen des Zellinhaltes in derselben Zelle. Auch die ungefärbten, bei hoher Einstellung dunklen, bei tiefer hellen Lücken treten bei der Fuchsinfärbung auf und zwar ebenfalls häufig innerhalb der kolbigen Anschwellungen der Stäbchen (Fig. X e^2). Während diese Bilder der Fuchsinfärbung besonders den Stäbchen zukommen, welche auf normalem Dextroseagar gewachsen sind, zeigen die auf Glycerinagar gezüchteten bedeutende Abweichungen. Die keuligen Anschwellungen der Stäbchen sind selten, fehlen oft ganz. Ebenfalls vermißt man die besonders in diesen Keulen, aber auch in anderen Zellabschnitten beobachteten Lücken. Vor allen Dingen sieht man aber bei der Färbung in erwärmter Fuchsinlösung, seltener nach der Einwirkung von kalter Lösung kräftig rote, kugelige, bei hoher Einstellung lichtbrechende Gebilde auftreten, die hier und da eine solche Größe erreichen, daß sie die Zellgrenzen überragen. Dieselben liegen meist in der Ein-, seltener in der Mehrzahl in den Stäbchen, bald an den Polen, bald mehr central (Cytoplasma) (Fig. X e^3, ^{4}, ^{5}). Letztere Lage scheint jedoch häufiger zu sein. Der übrige Teil des Stäbchens ist hellrot gefärbt. In anderen mehr gleichmäßig gefärbten Stäben erkennt man hier und da helle, lichtbrechende Stellen, deren Begrenzung unscharf ist. 20—30 Tage alte Kulturen zeigen Stäbchen, die sich mit wenigen Ausnahmen sehr schwach in Fuchsinlösung färben. Die Farbstoffaufnahme beschränkt sich auch hier auf einzelne kleinere Zellabschnitte. Kugelige, die Zellwand vorwölbende rote Gebilde, wie sie in jüngeren Kulturen in die Erscheinung treten, fehlen in den älteren ganz.

Karbolfuchsin färbt kalt (5 Minuten) schon die jungen Stäbe aus Dextroseagarkulturen ziemlich kräftigrot, die einen mehr, die anderen weniger; ungefärbt bleiben jedenfalls keine. Dunklere und hellere Stellen in demselben Stäbchen, sowie auch ungefärbte Lücken sind nicht selten (Fig. X e^6,^{7}). Auch die älteren Stäbchen verhalten sich, abgesehen von der mit Karbolfuchsin erreichten stärkeren Farbstoffaufnahme, entsprechend der einfachen Fuchsinfärbung.

Ziehl'sche Methode der Tuberkelbacillenfärbung.

Sie wurde in folgender Weise ausgeführt: In einem Porzellanschälchen wurde Karbolfuchsin über der kleinen Flamme eines Bunsenbrenners allmählich erwärmt. Das mit Material versehene und fixierte Deckglas wurde schwimmend auf die Oberfläche der Farblösung gelegt und diese bis zum leichten Aufkochen erhitzt. Nun wurde der Brenner beiseite gestellt und das Präparat noch etwa 1—2 Minuten in der Farblösung gelassen. Darauf wurde zunächst 15 Sekunden in 5-proz. Schwefelsäure entfärbt, dann 30 Sekunden in 70-proz. Alkohol, endlich unter der Leitung abgespült und in Wasser untersucht. Um die durch mehrfaches Abspülen in 70-proz. Alkohol diesem zugeführte Säure zu binden, wurde dem Alkohol eine Spur von Natriumkarbonat zugefügt.

Thimotheebacillen aus jungen, 2—3 Tage alten Kulturen zeigen sich gleichmäßig und kräftig rot gefärbt. Selten sieht man hellere Stellen (Vakuolen) (Fig. X e^8). Häufiger fallen diese letzteren an einem mit 4 Tage altem Glycerinagarmaterial angefertigten Präparate auf (Fig. X e^9, ^{10}). Stäbchen aus 5 und 6 Tage alten Kulturen geben wieder ein anderes Bild. Es treten nämlich jetzt die Kugeln auf, die schon bei der einfachen Fuchsinfärbung beobachtet wurden (Fig. X e^{11}, ^{12}). Dieselben erscheinen in sehr großer Zahl, sind bedeutend kräftiger gefärbt als der übrige Protoplast, zeigen bei hoher Einstellung Lichtbrechung und verursachen auffällige kugelige Anschwellungen der Stäbe (Cytoplasmaballen?). In etwa 8—12 Tage alten Stäben erscheinen ebenfalls dunkelrote, scharf begrenzte, etwas lichtbrechende, mehr oder weniger rundliche Körper, deren Durchmesser aber nur noch selten den der Bakterienzelle übertrifft. In einzelnen Präparaten von 9 und 10 Tage altem Material lagen diese Körper fast regelmäßig in Einzahl in der Mitte der noch relativ kurzen Zelle, und ein eigenartiges und charakteristisches Bild kam gerade dadurch zustande, daß der übrige Zellabschnitt bis auf einen matten Schimmer der Membran entfärbt war (Fig. X c^{13}, ^{14}, ^{15}). Alle Stäbchen, die unmittelbar aneinander zu liegen scheinen, sind trotzdem durch überall ziemlich gleiche ungefärbte Zwischenräume voneinander getrennt. Man sieht daher im Gesichtsfelde eine große Menge von ziemlich gleich großen, meist etwas länglichen, roten Flecken, die, mehr oder weniger scharf begrenzt, einen centralen Bestandteil der Stäbchen darstellen. Aeltere Stäbchen zeigen ein scharf gegliedertes Aussehen; es wechselten kräftig rot gefärbte Abschnitte mit völlig ungefärbten unvermittelt ab (Fig. X f^1, ^{2}, ^{3}) (weiß = Fett). Häufig ist diese Gliederung durch ziemlich gleiche Größe von roten und weißen Segmenten eine auffallend regelmäßige. Je älter die Stäbchen, je kleiner werden in der Regel die rotgefärbten Glieder und um so größer die weißen. Eine kugelige Anschwellung der roten Gebilde, wie sie in jüngeren Stadien beobachtet wurde, tritt nicht ein.

Gram'sche Methode. 6 Tage alte Stäbchen bleiben sämtlich gefärbt und zwar schwarzblau (Fig. X g^1, ^{2}). Selbst nach $^1/_2$-stündigem Aufenthalt in absolutem Alkohol hat nur ein kleinerer Teil der Stäbchen eine hellere violette Färbung angenommen. Zwischen zwei aneinanderliegenden Bakterien liegt kein ungefärbter Zwischenraum. Aeltere Stäbchen (20 Tage) färben sich ebenfalls gut nach dieser Methode. Die lichtbrechenden, im Zellinhalte liegenden Körper bezw. Kugeln bleiben als weiße, noch lichtbrechende Flecke erhalten und nehmen eine sehr instruktive Gegenfärbung in Sudanlösung an (Fett) (Fig. X g^3). Etwa 30

Tage alte Stäbchen zeigen ein ebensolches segmentiertes Aussehen, wie es die nach dem Ziehl'schen Färbeverfahren behandelten Thimotheebacillen schon in bedeutend jüngeren Stadien zu erkennen geben. Blauschwarze Glieder wechseln mit ungefärbten, noch lichtbrechenden ab.

Ehe ich zur Beantwortung der Frage übergehe, in welcher Weise die Organe und ergastischen Gebilde des Bakterienleibes durch die verschiedenen Reagentien verändert werden und hervortreten, wird es zweckmäßig sein, erst die Resultate der Untersuchung über die Gram'sche Färbung, die Säurefestigkeit und eine Art von Einschlüssen, welche wir als Volutanskugeln bezeichnet haben, mitzuteilen, da diese noch einige wichtige Aufschlüsse über die in Rede stehende Frage geben.

Die Gram'sche Methode der Bakterienfärbung.

Im Jahre 1884 führte Gram eine neue Methode der Bakterienfärbung, welche ich bereits p. 8 genau beschrieben und bei der Untersuchung von B. tumescens, B. cohaerens und des Thimotheebacillus verwendet habe, in die bakteriologische Technik ein. Das Verfahren hat in der Differentialdiagnostik der pathogenen Mikroorganismen eine weitgehende Beachtung erfahren, weil eine Reihe von Bakterienarten nach Behandlung mit dieser Methode sich stets gefärbt, eine andere sich stets ungefärbt zeigen soll.

Es liegt jedoch eine größere Zahl von Beobachtungen vor, nach welchen sich große Verschiedenheiten einzelner Bakterien in ihrer Neigung, nach der Gram'schen Methode gefärbt zu bleiben oder sich zu entfärben, bemerkbar gemacht haben. Wilde (1896. p. 17) fand, daß die von ihm untersuchten Kapselbakterien sich sämtlich nach der Gram'schen Methode entfärben, während Bordoni-Uffreduzzi (1884) beobachtet hatte, daß die längeren Formen seines Proteus capsulatus hominis, der auch von Wilde untersucht wurde, gefärbt blieben, die kürzeren dagegen sich entfärbten. Wilde verlangt, daß zur Entscheidung der Frage, ob ein Bakterium der Gram'schen Färbung zugänglich sei oder nicht, nur ein Präparat benutzt werden dürfe, welches von einer Reinkultur auf den gewöhnlichen Nährböden stammt. Denn daß die chemische Zusammensetzung des Nährbodens in gewissen Fällen von Einfluß auf das in Rede stehende Verhalten sei, erscheine ihm nach dem Befunde von Mills (1892) zweifellos. Dieser hat Bacillen aus Eiter nach Gram gefärbt gefunden, dagegen dieselben Bacillen von einer Kultur ungefärbt. Desgleichen fand Schmidt (1892), daß B. coli commune und B. lactis aërogenes bei höherem Fettgehalt des Darmbreies, dem sie entnommen waren, sich nicht entfärbten, während bei niederem Fettgehalt des Darminhaltes sie stets entfärbt wurden. Es ist in diesem Falle jedoch fraglich, ob die in Vergleich gezogenen Species auch identisch gewesen sind. Schmidt hat dann auch experimentell dem erstgenannten Bacterium durch längere Kultur auf Buttergelatine ein positives Verhalten nach der Gram'schen Methode anzuzüchten vermocht (ich verweise auf ähnliche Beobachtungen, die betreffs der Säurefestigkeit der Tuberkelbacillen gemacht sind, p. 28). Wilde ist dies nicht gelungen; er machte dagegen die Beobachtung, daß ein von ihm auf Mäuse überimpfter Kapselbacillus, dem Rückenmark des betreffenden Tieres entnommen, die Färbung behielt, jedoch derselbe auf Nährböden übertragen diese Eigenschaften wieder verlor. Paltauf

(1891/92) giebt an, daß unter Umständen ein positives Verhalten gewisser Bacillen gegen die Gram'sche Methode durch bestimmte Fixierungsmittel (Müller'sche Flüssigkeit, Osmiumsäure, Alkohol) hervorgerufen werden könne. Es handelte sich hier immer um Gewebeschnitte. Zimmermann (1890) will beobachtet haben, daß B. pyocyaneus und andere fluorescierende Bacillen, welche die Gelatine nicht verflüssigen, in ihren jüngsten Kolonieen bei kurzer Entfärbung die Gram-Farbe behalten. Diese Bakterien sind im übrigen durch absolut negatives Verhalten gegen die Gram'sche Methode ausgezeichnet. Kutscher (1894) wies nach, daß der Rauschbrandbacillus und der Bacillus des malignen Oedems, welche bis dahin als nach der Gram'schen Methode nicht färbbar galten, sich nicht entfärben, wenn sie besonders intensiv gefärbt werden. Er wurde durch den Befund, daß die Bacillen der Pseudotuberkulose der Nagetiere sich nach der Gram'schen Methode teils stark, teils schwach, teils gar nicht färbten, veranlaßt, das Färbevermögen des Anilinwassergentianavioletts zu erhöhen. Er vermochte nun entweder die Färbung dadurch zu erhalten, daß er eine nach besonderer Vorschrift angewendete, stark wirkende Anilinwassergentianaviolettlösung verwendete, oder dadurch, daß er die gebräuchliche Ehrlich'sche Lösung während 20—24 Stunden bei 37° C einwirken ließ. Zu den Bakterien, die sich trotz Anwendung Kutscher's Methode entfärben, gehören die Bakterien des Typhus, des Rotzes, der Schweineseuche, der Friedeberger Fleischvergiftung, der Choleravibrio, der Elbvibrio, der Gonococcus Neisser und die Rekurrensspirillen. Kutscher weist schließlich auf die Säurefestigkeit der so gefärbten Bacillen (gegen 5-proz. Schwefelsäure) hin. Nach der Ansicht von Czaplewski (1896) hängen die widersprechenden Angaben über die Färbbarkeit mancher Bakterien nach Gram z. B. des Diphtheriebakterium mit der Erscheinung, daß die Gram'sche Reaktion an aus älteren Kulturen stammenden Bakterien schlecht oder gar nicht eintritt, zusammen. Das Diphtheriebakterium färbt sich nur in jugendfrischen Exemplaren. Von einem solchen Verhalten der Diphtheriebakterien erwähnt Flügge (1896) nichts, er hebt dagegen hervor (p. 461), daß die Diphtheriebakterien nach Behandlung mit dem ursprünglichen Gram'schen Verfahren gefärbt bleiben, aber durch die Günther'sche Modifikation jenes Verfahrens (siehe p. 15), sowie durch längere Einwirkung von Alkohol oder Anilinöl vollständig entfärbt werden. Ferner erwähnt Flügge, daß die Angehörigen der Gruppe des Bacillus sputigenes tenuis nur eine relative Empfänglichkeit für die Gram'sche Färbung besitzen. Unter Umständen soll die Färbung nur bei Bacillen in den Schnitten, welche durch Chromsäure oder Osmiumsäure fixiert waren, bestehen bleiben, in anderen nicht. Bei anderen Bakterien sollen sich nicht alle Individuen gleichmäßig färben, wie beim B. haemorrhagicus und B. exanthematicus. Ueber das Verhalten des Gonococcus Neisser haben viele Untersucher sich verschieden geäußert. Nach den Einen, denen die Allgemeinheit sich angeschlossen hat, soll er sich entfärben; Andere dagegen haben gefunden, daß er in einem Präparate sich verschieden verhält, und wieder Andere, daß er gefärbt bleibt. Da unbekannt ist, wie die Untersucher im betreffenden Falle das Gram'sche Verfahren gehandhabt haben, können die Befunde nicht beurteilt werden. Hijmanns van den Berg (1896. p. 791) erprobte deshalb die Färbung von neuem unter verschiedenen Gesichtspunkten. Er fand, daß der Gonococcus die Farbe behält bei Verwendung einer konzentrierten Farblösung und bei einer nicht länger als 30 Sekunden

währenden Einwirkung des absoluten Alkohols und spätestens nach einer $2^1/_2$ Minuten langen Einwirkung des Alkohols die Farbe verliert. Hijmanns van den Berg empfiehlt deshalb, den Alkohol mindestens $2^1/_2$ Minuten einwirken zu lassen. Günther (1898. p. 143) betont ausdrücklich, daß jede Bakterienart sich entweder auf die eine oder auf die andere Seite stellt; die einen sollen sich nach der Gram'schen Methode färben, die anderen nicht. Eine Zwischenstufe gebe es nicht. Günther bringt die zweifelhaften Ergebnisse vieler Beobachter mit einer nicht richtigen Anwendungsart des Alkohols in Verbindung. Er hält es für einen großen Fehler, den Schnitt längere Zeit in demselben Alkohol, der die Flüssigkeit aus dem Schnitt angenommen habe, auch stets Luftfeuchtigkeit anziehe, liegen zu lassen. Ein solch geringer Wasserzusatz zu dem absoluten Alkohol (Alkohol absolutus des deutschen Arzneibuchs) genüge schon, eine stärkere Entfärbung zu bewirken. Es sei daher der Schnitt im Alkohol hin- und herzubewegen und nach etwa 1 Minute frischer Alkohol zu verwenden. Ebenso wie im allgemeinen die mit den gebräuchlichen Anilinfarben gefärbten Präparate von Bakterien, so seien auch „ganz im allgemeinen die nach der Gram'schen Methode gefärbten Bakterienpräparate in ihrer Färbung schier unbegrenzt alkoholresistent.“ Kisskalt (1901. p. 183) prüfte die Wirkung verschiedener Alkohole auf die gefärbten und mit Jodjodkaliumlösung behandelten Präparate und fand, daß die meisten Bakterien, abgesehen von Vibrionen und einigen fluorescierenden Bacillen, die Gram'sche Farbe behalten, wenn man die Entfärbung in Amylalkohol vornimmt. Schon stärker entfärbt der Butylalkohol, aber nicht so stark als Propyl- und Aethylalkohol. Noch stärker als letzterer wirkt der Methylalkohol, welcher sogar den Milzbrandbacillus entfärbt, die Mikrokokken, B. Zopfii und B. subtilis dagegen nicht.

Aus diesen Litteraturangaben geht hervor, daß die verschiedenartigsten Momente imstande sind, an dem Eintreten einer positiven oder negativen Gram'schen Reaktion mitzuwirken. Selbst unter Berücksichtigung der Günther'schen Bedenken, daß manche jener Angaben auf einer nicht zweckmäßigen Anwendung des Alkohols beruhe, muß man zu der Ueberzeugung kommen, daß die verschiedenen Bakterienspecies sich verschieden leicht oder schwer entfärben. Ein verhältnismäßig leicht entfärbbares Bakterium ist z. B. der Rauschbrandbacillus, ein ganz leicht entfärbbares ist Spirillum, ein sehr schwer entfärbbares Bacillus tumescens. Auch Czaplewski (1896) weist schon darauf hin, daß eine scharfe Grenze nicht besteht und daß unter den Bakterien, welche nach Gram gefärbt bleiben, erhebliche Unterschiede in der Fähigkeit, den Farbstoff zurückzuhalten, vorhanden sind.

Wenn in den oben erwähnten Fällen der Alkohol richtig angewendet wurde (d. h. nach Günther's Vorschrift wasserfreier Alkohol) und die in den krankhaften Teilen gesehenen Bakterien auch thatsächlich mit den auf künstlichem Nährboden reingezüchteten übereinstimmen, so kann man zweitens schließen, daß unter Umständen eine bestimmte Species die Alkoholfestigkeit auf bestimmten Nährböden verlieren kann (Mills und Wilde). Es gehört hierher auch die Angabe von Schmidt, daß auf fetthaltenden Nährböden eine Species alkoholfester werden könne, der jedoch von Wilde widersprochen wird. Drittens geht aus den Beobachtungen von Paltauf und Flügge hervor, daß die verschiedenen Fixierungsmittel nicht ohne Einfluß auf die Alkoholfestigkeit sind. Viertens fand man, daß eine längere Einwirkung der Farblösung oder eine Verstärkung der letzteren von Einfluß war (Kutscher, Hijmanns van

den Berg). Fünftens geht aus den Litteraturangaben hervor, daß die Entfärbung durch Alkohol von der Konzentration und der Zeitdauer der Einwirkung abhängt. Sechstens ist bekannt, daß Salzsäurealkohol, der in der Günther'schen Modifikation zur Verwendung kommt, stärker wirkt als absoluter; siebentens sagt uns die Angabe von Czaplewski und Anderen, daß Bakterien aus jungen Kulturen sich schwerer entfärben als solche aus älteren. Die Beobachtung von Bordoni-Uffreduzzi, nach welcher kürzere Formen derselben Bakterienart sich entfärben, längere dagegen gefärbt bleiben sollen, ist schwer verständlich. Man muß entweder an eine verunreinigte Kultur oder an Degenerationsformen, auf deren Bedeutung bei Beurteilung des Verhaltens eines Bakteriums der Gram'schen Methode gegenüber ich weiter unten zu sprechen kommen werde, denken.

Von R. und W. Albert (1901) und besonders von Trommsdorf (1902) sind einige Versuche gemacht worden, um die Ursache der positiven Gram-Färbung der Hefezellen festzustellen. R. und W. Albert zeigten, daß durch Alkohol und Aether getötete Hefe bei der Selbstverdauung in Wasser unter Zusatz von Toluol oder Chloroform bei 40—45° C ihre Alkoholfestigkeit verliert, wobei von vornherein zu berücksichtigen ist, daß bei diesem Prozeß fast der ganze Inhalt der Zelle aus der Membran herausgelöst wird. Trommsdorf findet zunächst, daß der Glykogengehalt der Hefezellen mit der Alkoholfestigkeit nichts zu thun hat. Ferner stellte er fest, daß gekochte Hefe durch Behandlung mit Pepsin und Trypsin und ebenso durch trockenes Erhitzen der Hefe während 2 Stunden auf 120° die Alkoholfestigkeit verliert. Letzteres soll auch für die Milzbrandbacillen gelten. Es geht aus diesen Mitteilungen also hervor, daß die die Gramfestigkeit bedingenden Stoffe bei starker trockener Erhitzung und lang andauernder Verdauung zerstört bezw. herausgelöst werden. Weitere Schlüsse lassen sich auf die Natur des Körpers nicht ziehen. Was die Verdauungsversuche anbelangt, so konnte ich feststellen, daß bei den von mir untersuchten Bakterien die Färbung nach Gram weder durch Pepsin- noch durch Trypsinlösung ungünstig beeinflußt wurde (siehe p. 27).

Um die Einwendung Günther's gegen die Auffassung vieler Untersucher, welche einem längeren Verweilen der Präparate im Alkohol eine weitere Entfärbung zuschreiben, zu prüfen, stellte ich zuerst mit Präparaten verschiedener Bakterien, die, nach dem Gram'schen Verfahren behandelt, eine sehr kräftige Färbung behalten, ebensolche Versuche an, wie sie Günther (1898. p. 143) empfiehlt. Ich benutzte einen Alkohol absolutissimus, der zur Bindung der kleinsten Wassermengen über gebranntem Kupfersulfat gehalten wurde. Eine Abspülung in Wasser vor dem Alkoholbade erfolgte bei meinen Versuchen nie. Ich kann auf Grund meiner Beobachtungen Günther darin zustimmen, daß wässerig gewordener absoluter Alkohol die Entfärbung der Präparate außerordentlich beschleunigt. Aber auch in meinem völlig wasserfreien Alkohol trat an Präparaten des B. cohaerens und des Thimotheebacillus nach 20—24 Stunden bei letzterem völlige, bei ersterem teilweise Entfärbung ein, obwohl die Präparate sehr kräftig gefärbt und der Versuch in mit Glasstöpseln versehenen Flaschen unter Abschluß des Lichtes vorgenommen wurde. Es entfärbten sich scheinbar nicht so viele Stäbchen von B. cohaerens in jener Zeit, wenn ich das Präparat nach der Jodjodkaliumbehandlung erst lufttrocken werden ließ.

Ferner prüfte ich das Verhalten von degenerierten Bakterien der

Gram'schen Methode gegenüber. Ich wählte hierzu den B. cohaerens A. Meyer et Gottheil, welcher einmal im normalen Zustande nach Behandlung mit der Gram'schen Methode sehr kräftig gefärbt bleibt, ferner schon frühzeitig viele Degenerationsstadien aufweist. Die Untersuchungsergebnisse habe ich bereits bei der Bearbeitung jenes Bacillus (p. 9 u. 15) mitgeteilt. Sie hatten das interessante Ergebnis, daß sich in völlig plasmaleer erscheinenden Zellen durch Zusatz von Jodjodkaliumlösung *k* ein unregelmäßiger, fleckiger, gelber und mattlichtbrechender Inhalt nachweisen läßt, der sich in den gebräuchlichen Anilinfarben nicht mehr färbt (es tritt dann nur die z. B. in Fuchsin rot gefärbte Membran hervor. Fig. IX *e*). Dagegen nehmen diese Plasmareste die Gram'sche Färbung noch recht gut auf und behalten sie auch in Alkohol (Fig. IX *i*). Die Membran zeigte in diesen Fällen niemals eine Färbung nach Gram.

(Fortsetzung folgt.)

Studien zur Biologie des Influenzabacillus.

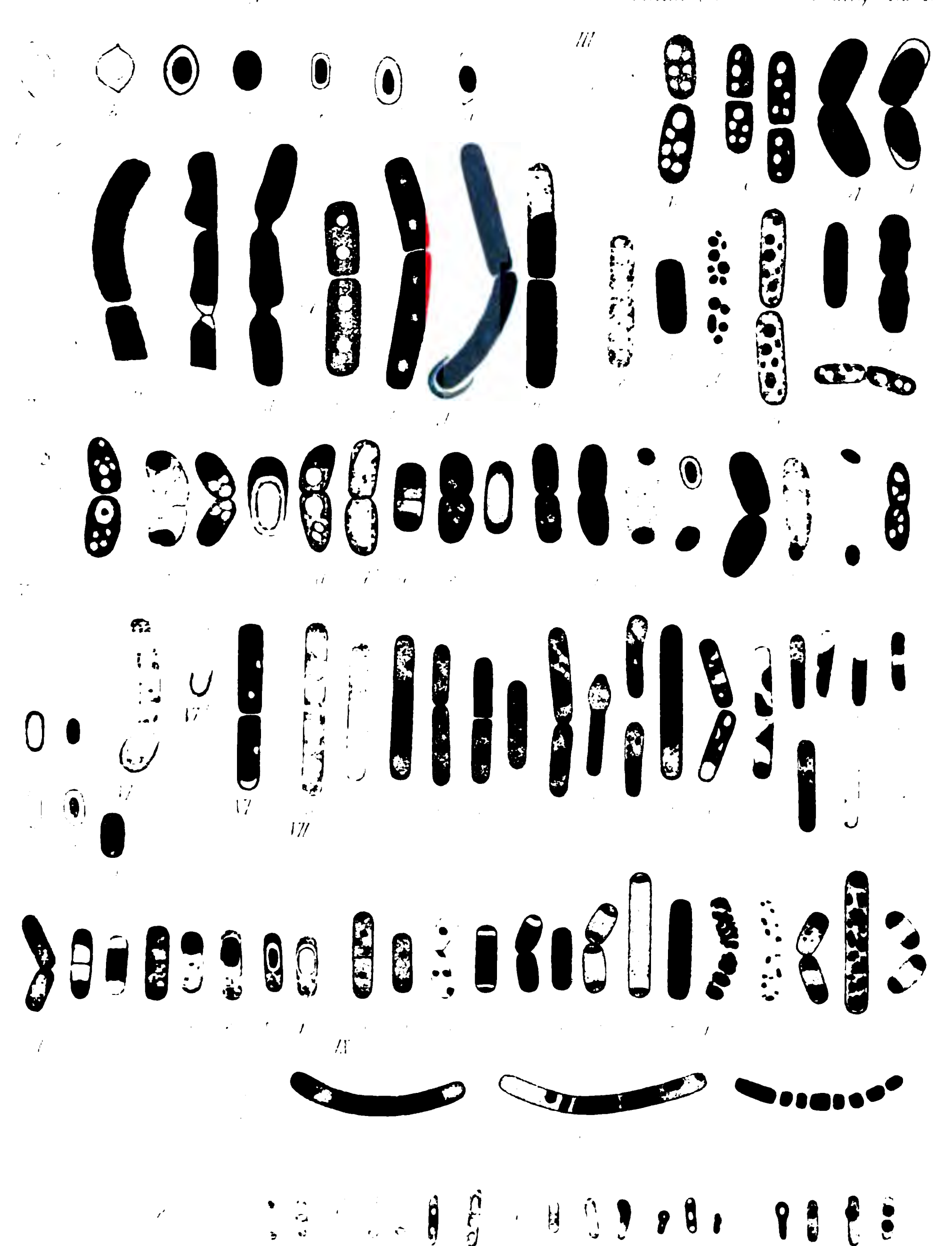
[Aus dem pathologisch-anatomischen Institute in Wien (Prof. A. Weichselbaum).]

Von Assistenten Dr. **A. Ghon** und Dr. **W. v. Preyss.**

I.

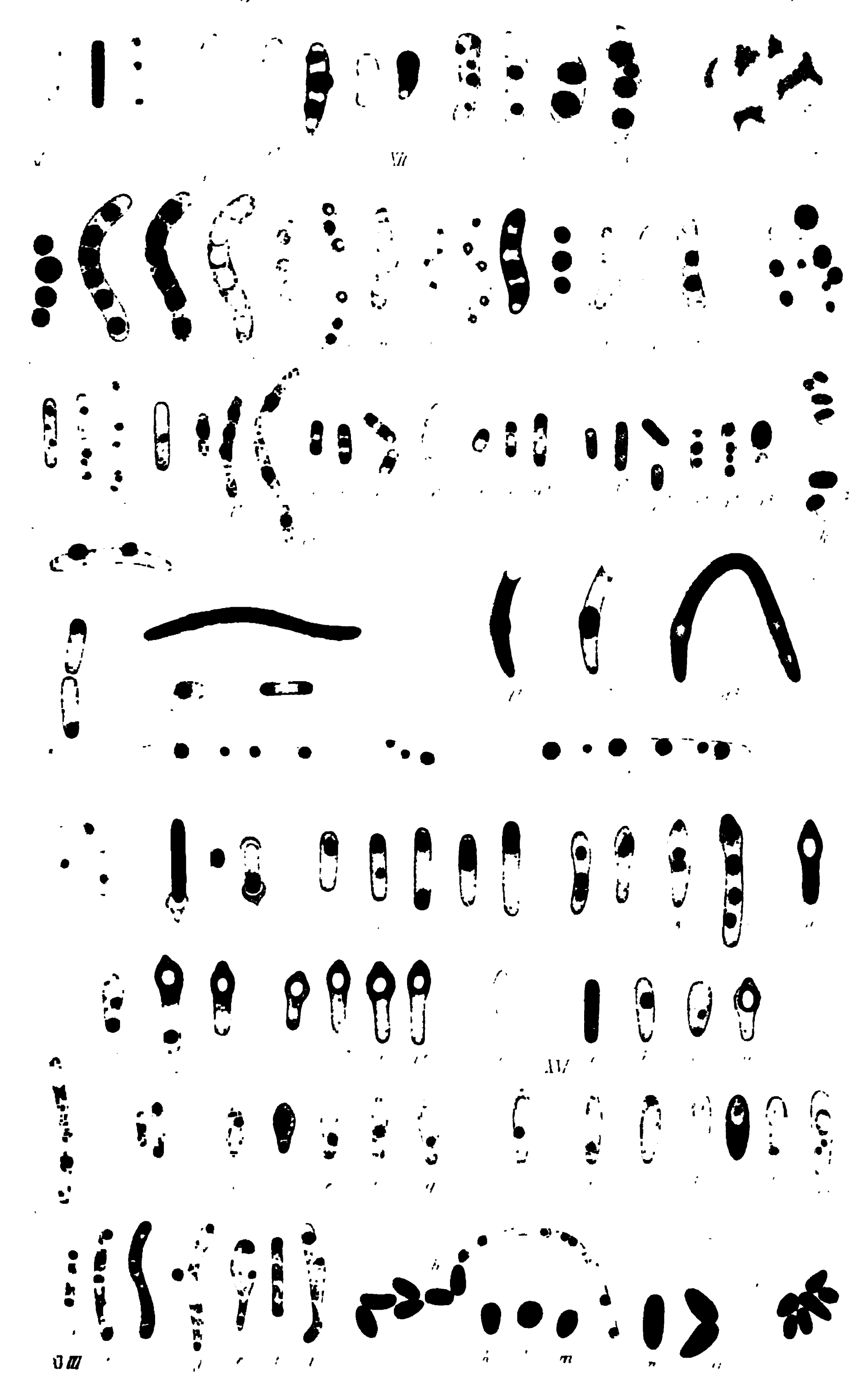
Im Jahre 1893 veröffentlichte R. Pfeiffer seine ausführliche Arbeit über die Aetiologie der Influenza (Zeitschr. f. Hyg. Bd. XIII) und besprach darin in eingehender Weise die Methode der Kultivierung des Influenzabacillus. Pfeiffer hatte dabei herausgefunden, daß derjenige Nährstoff, der von den Influenzabacillen assimiliert wird und für ihr Gedeihen unentbehrlich ist, das Hämoglobin sei, daß auch auf Blutagarröhrchen, die 1 Stunde lang auf 70° C erhitzt wurden, der Influenzabacillus noch recht gut gedeihe und daß auch „das durch Kochen geronnene Hämoglobin eine, wenn auch sehr sparsame, doch merkliche Entwickelung der Influenzastäbchen ermöglicht". Daraus glaubte Pfeiffer schließen zu können, daß der Eisengehalt des Hämoglobins das wirksame Prinzip für das Wachstum des Influenzabacillus sei, und dieser Gedanke fand für Pfeiffer darin eine Stütze, daß gewisse bereits bekannte Mikroorganismen ausschließlich in eisenhaltigen Nährlösungen gedeihen können. Seine diesbezüglichen Versuche mit Eisenalbuminat hatten damals allerdings kein Resultat ergeben, doch sprach Pfeiffer die Hoffnung aus, durch systematisch durchgeführte Experimente mit Eisensalzen einen Nährboden finden zu können, der es ermöglicht, „von dem immerhin umständlich herzustellenden Blutagar abzusehen".

Diese Umständlichkeiten bei der Herstellung des Nährbodens, vor allem aber die Schwierigkeiten, welche die so häufigen Verunreinigungen des Blutes mit sich brachten, veranlaßten Huber (Zeitschr. f. Hygiene. Bd. XV), nach einem bequemeren Nährboden zu suchen. Er verwendete dazu das Hämatogen (Hommel). Dieses Präparat ist aber nicht keimfrei und gerinnt beim Sterilisieren im strömenden Dampfe zu dicken, undurchsichtigen, braunen Klumpen. Durch Zusatz von KHO bis zur



Verl. v. Gustav Fischer, Jena.





Gustav Fischer



stark alkalischen Reaktion gelang es jedoch, ein bei 100° C flüssig bleibendes Präparat herzustellen, das, filtriert, auch bei wiederholtem Sterilisieren klar blieb. 0,5 ccm der Lösung wurden verflüssigtem Agar bei 50—60° zugesetzt. Der Nährboden war durchsichtig, das Wachstum des Influenzabacillus darauf jedoch „erheblich“ langsamer als auf Blutagar. Meist 3—5, mitunter gar erst 8—10 Tage nach der Impfung nahm man die Kolonieen wahr. Die auf diesem Nährboden gewachsenen Bacillen zeichneten sich jedoch durch eine größere Lebensdauer aus. Auch Huber ist, wie Pfeiffer, der Meinung, daß das Hämoglobin nicht in seiner Eigenschaft als Sauerstoffträger, sondern wahrscheinlich wohl infolge seines Eisengehaltes der für das Gedeihen der Influenzakolonieen unentbehrlichste Faktor sei.

Einen weiteren Versuch, den von Pfeiffer angegebenen Nährboden durch andere, künstlich herstellbare, zu ersetzen, machte Nasstjukoff (Wratsch. 1893 u. Inaug.-Diss. 1894. Petersburg, Ref. Centralbl. f. Bakt. etc. Bd. XIV u. XIX) bei seinen Studien über die Influenza. Er verwendete dazu das Hühnereigelb, indem er von dem Gedanken ausging, daß dieses chemisch dem Blute verwandt sei und daß das Eisen — auch seiner Meinung nach der erforderlich Nährstoff — im Blute sowohl wie im Eigelb in Form komplizierter organischer Verbindungen vorhanden sei: als Hämoglobin im ersteren, als Hämatogen im letzteren. Nasstjukoff benutzte flüssige und feste Eigelbnährböden. Erstere wurden dadurch hergestellt, daß in 1 l destillierten Wassers, welches mit 5 g einer 10-proz. Lösung von NaHO alkalisiert war, 100 ccm Eigelb gelöst wurden, letztere dadurch, daß 1 l der Eigelblösung 15—20 g Agar oder 80—100 g Gelatine zugesetzt wurden.

Auch M. Richter (Wien. klin. Wochenschr. 1894) unternahm, „teils um den eigentlichen ‚Nährstoff‘ der Influenzabakterien zu finden, teils in der Hoffnung, einen einfacheren Nährboden darstellen zu können“, Versuche, auf anderen Nährböden zu züchten und fand, daß auch Wachstum zu erzielen war auf Agar, welcher mit sterilisiertem Sputum, steriler Galle, Tauben- und Hühnereigelb bestrichen war, doch so kümmerlich, daß diese Körper für den praktischen Zweck nicht in Betracht kommen können. Ziemlich üppig war das Wachstum auf einem mit Blut gemengten, durch mehrmaliges Erhitzen auf 60—70° C sterilisierten Eiter. Trippereiter, analog behandelt, erwies sich jedoch als vollkommen ungeeignet. Ebenso zeigten sich Hämatinlösungen (nach Cazeneuve) als unbrauchbar, und auf dem von Huber empfohlenen Hämatogennährboden war das Wachstum so gering, daß Richter dieses Präparat zur Züchtung für ungeeignet hält. Unverwendbar war ferner der von Nasstjukoff eingeführte Eigelbagar, desgleichen blieben Versuche mit der Eiseneiweißverbindung unserer Nahrungsmittel, dem Ferratin (Schmiedeberg), ohne Erfolg. Richter schloß aus seinen Untersuchungen, daß das Blut in toto für das Wachstum der Influenzabacillen nicht unumgänglich notwendig sei. Ein Teil der mit Erfolg verwendeten Körper, wie Galle und Eigelb, ist durch das Vorhandensein von organischen Eisenverbindungen merkwürdig und es wäre deshalb immerhin möglich, daß diese für die Züchtung der Influenzabacillen jene Bedeutung haben, welche Pfeiffer der Eisenverbindung des Blutes zuschreibt.

Die früher erwähnten Versuche von Nasstjukoff wurden auch von Voges (Berl. klin. Wochenschr. 1894) nachgeprüft, doch durchaus mit negativem Resultate: es gelang ihm nie, Influenzabacillen auf dem

Eigelbnährboden zum Wachstum zu bringen. Desgleichen schlugen auch die Versuche fehl, im Hühnerei selbst den Influenzabacillus zu züchten. Dagegen hatte Voges gute Erfolge, als er das von Pfeiffer angegebene Verfahren dahin modifizierte, daß er einige Tropfen des zu verwendenden Blutes in die Petri-Schale brachte, den flüssigen Agar von 100° C hinzufügte und auf dem Gemisch, nachdem es erstarrt war, das Influenzamaterial aussäte. Positive Resultate erhielt Voges auch, wenn er Hämoglobin, das aus Menschenblut dargestellt war, dem Agar zusetzte.

Mit Erfolg verwendete A. Capaldi (Centralbl. f. Bakt. etc. Abt. I. Bd. XX. 1896) das Eidotter zur Züchtung von Bakterien überhaupt. Dabei trat er auch der Frage näher, welcher von den Körpern des Eidotters die Nährkraft besitze, und prüfte daraufhin das Lecithin und Hämatogen. Die Nachprüfung der Versuche von Nasstjukoff, die Capaldi anschließend ausführte, ergaben, daß, wenn Influenzabacillen auf Eigelbnährböden wachsen, ihr Wachstum ein sehr kümmerliches sei. Das Hämatogen stellte Capaldi nach Bunge dar, indem er den Aetherrückstand der Lecithinbereitung in 1 ‰ HCl löste, filtrierte und mit etwas Pepsin und HCl 3 ‰ bei 37° im Brütschranke stehen ließ. In der opalescierenden Flüssigkeit entstand allmählich ein Niederschlag, der abfiltriert, mit Alkohol ausgekocht und mit Aether extrahiert wurde. In NH_3 gelöst, wurde er mit Alkohol gefällt. Der so erhaltene Niederschlag wurde in steriler Petri-Schale bei 56° getrocknet. Influenzabacillen kamen auf dem damit bereiteten Nährboden nicht fort, woraus Capaldi schloß, daß das Wachstum der Influenzabacillen auf Eiernährboden von der Anwesenheit des Hämatogens nicht abhänge.

Einen neuen Körper nahm A. Cantani (Centralbl. f. Bakt. etc. Abt. I. Bd. XXII. 1897) in Arbeit, indem er versuchte, Sperma als Nährboden zu verwenden. Er benutzte dazu reines Sperma, welches aus möglichst frischem Nährboden unter aseptischen Maßnahmen gewonnen wurde, bei weiteren Versuchen auch Hodensaft. Das Sperma wurde in der Weise extrahiert, daß der Funiculus spermaticus zwischen 2 Fingern gepreßt und das dabei herausgekommene Sperma ohne weitere Sterilisation aufgestrichen wurde, der Hodensaft wieder derart, daß nach Abziehen der Kapsel und oberflächlicher Sterilisation mit Alkohol und Aether mit sterilem Messer eingeschnitten und vom Schnittsafte abgestreift wurde. Das Sperma wurde angeblich mit großer Sorgfalt gewonnen, um jede Beimischung von Blut zu verhindern. Bis zur 30. Generation konnte Cantani auf diesem Nährboden Influenzabacillen weiterzüchten. Bei dem Versuche, die eigentlich fördernden Stoffe, die dem Sperma und Blute gemeinsam sein müßten, herauszubekommen, fand Cantani, daß auf nukleïn- und lecithinhaltigem Nährboden kein Wachstum erfolge, wohl aber auf solchem mit Zusatz von Cholestearin und Serumalbumin.

Hatten sich die bisher angeführten Autoren hauptsächlich mit der Nährbodenfrage für den Influenzabacillus beschäftigt, so sehen wir einen neuen Pfad eingeschlagen in der Arbeit von R. Grassberger (Zeitschr. f. Hyg. Bd. XXV), welcher jene interessanten Versuche veröffentlichte über die günstige Beeinflussung der Influenzabacillenkolonieen in ihrem Wachstum durch den Staphylococcus pyogenes aureus und andere Bakterien (Riesenkolonieen). Die Beobachtung, daß diese Wachstumsbegünstigung der Influenzakolonieen in „weiter Umgebung“ des fördernden fremden Keimes auftrat, veranlaßte Grassberger, zu schließen, daß diese Begünstigung an diffundierende Substanzen ge-

bunden sei, die beim Wachstum der betreffenden fördernden Keime entstehen.

Verwendete Grassberger nun 24-stündige Agarkulturen von Staphylococcus pyogenes aureus, die er ca. 1/4 Stunde im Dampfkochtopfe sterilisierte, dann ausgoß und nach dem Erstarren mit einem Influenzabacillenblutgemisch bestrich, so erhielt er gleichfalls Riesenwachstum. Verwendete er jedoch Agar, auf dem durch mehr als 2 Tage Staphylokokken gewachsen waren, so mißlang der Versuch häufig und die Platten blieben steril. Auch bei weiteren Nachuntersuchungen mit sterilisierten Nährböden, auf welchen vorher Bakterien gewachsen waren, erhielt Grassberger keine konstanten Resultate. Es handelt sich also nach der Meinung von Grassberger um Substanzen, die, beim Bakterienwachstum gebildet, in die Umgebung diffundieren und bei kürzerer Sterilisation nicht immer zerstört werden. In dem Bestreben, die Ursache dieser Erscheinung zu finden, vermutete Grassberger diese zunächst in Alkalescenzunterschieden des Nährbodens, fand aber, daß der Influenzabacillus in Reinkulturen allerdings eine gewisse Empfindlichkeit gegenüber Alkalescenzdifferenzen zeige, daß er aber in Mischkultur mit dem Staphylococcus pyogenes in hohem Grade tolerant sei gegen Differenzen in der Reaktion des Nährbodens.

Versuche mit Eisensalzen und Gallenfarbstoffen (keine neuen Präparate), die er in alkalischen Lösungen anstatt des Blutes verwendete, schlugen fehl. Niemals konnte darauf Grassberger Wachstum erzielen, auch nicht bei gleichzeitiger Staphylococcus-Impfung. Positive Resultate erhielt er mit alkalischer 1-proz. Lösung von Hämoglobin (Hommel). Dabei schien es ihm aber, als ob Influenzareinkulturen gegen Hämoglobinlösungen empfindlicher wären als gegen Blut.

Grassberger hält die Annahme für wahrscheinlich, daß es sich bei dem von ihm beobachteten fördernden Einflusse von Staphylokokken auf Influenzabacillen um eine Einwirkung auf den Blutfarbstoff seitens bakterieller Produkte handelt, welche zu einer solchen Veränderung derselben führen — sei es veränderte Löslichkeit oder eine chemische Alteration im engeren Sinne — daß dann der Blutfarbstoff von den Bacillen erfolgreich assimiliert werden kann. Diese Fähigkeit kommt nach Grassberger auch dem Influenzabacillus selbst zu, wenn auch in geringerem Grade. Grassberger glaubt deshalb auch, in Hinkunft auf die Provenienz des zur Agarbereitung verwendeten Fleisches besondere Aufmerksamkeit richten zu müssen, da man im Nährboden bereits fördernde Produkte vorgebildet finden könne, wenn für die Bereitung ein Fleisch verwendet wurde, in dem bereits ausgiebige bakterielle Zersetzungen stattgefunden haben.

In einer zweiten Arbeit (Centralbl. f. Bakt. etc. Abt. I. Bd. XXIII), in der Grassberger auch die von Voges seiner Zeit angewendete Methode nachprüfte, fand er, daß das Blut auch durch 1-stündiges Verweilen bei einer Temperatur von 50—60° in dem für das Influenzabacillenwachstum günstigen Sinne verändert wird. Er glaubt, daß die durch das Erhitzen des Blutes erfolgte fördernde Veränderung desselben weder in einer Lösung des Blutfarbstoffes begründet sein kann, da durch Blut, das in verschiedener Weise lackfarben gemacht wurde, diese Wirkung nicht zu erzielen ist, noch in der mit dem Erhitzen einhergehenden Hämatinbildung; denn alkalische Lösungen von reinem Hämatin, mit heißem Agar vermischt, ergaben meist negatives Resultat, während Hämatinagar mit Staphylokokkenimpfung konstant üppiges Riesenwachs-

tum erkennen ließ. Nach Grassberger's Meinung haben diffundierende Stoffwechselprodukte aus dem Hämatin das für das Influenzawachstum günstige Produkt entwickelt, doch sind die Veränderungen, die das Hämatin dabei erleidet, nicht bekannt. Nach allem vermutet aber Grassberger, daß Bakterien- und Hitzeeinwirkung analoge Prozesse darstellen.

In einer größeren Abhandlung endlich berichtete in jüngter Zeit A. Cantani jun. (Zeitschr. f. Hyg. Bd. XXXVI) über das Wachstum der Influenzabacillen in hämoglobinfreien Nährböden. In dieser Arbeit verweist er zunächst auf seine früheren Untersuchungen mit dem Spermanährboden. Auf reinem Blutserum, welches auch spektroskopisch keine Spur von Hämoglobin enthielt, wuchsen die Influenzabacillen sehr spärlich. Im Serum mit gewöhnlicher Peptonbouillon zeigte sich jedoch ganz gutes Wachstum, während Serum mit Agar in demselben Verhältnisse keine so guten Resultate ergab. Mit Ascitesflüssigkeit waren die Verhältnisse dieselben. Milch, albuminreicher Urin, ebenso sterilisiertes Ei (100°) mit Agar erwiesen sich als ungeeignet. Meerschweinchen- und Kaninchengalle hatten keinen Einfluß, wohl aber Menschengalle (stark mucinhaltig). Cantani glaubt demnach, daß die Anwesenheit von Hämoglobin für das Influenzawachstum nicht nötig sei, daß Wachstum auch auf hämoglobinfreiem Serum, Ascitesflüssigkeit und Menschengalle erfolge.

In einer zweiten Versuchsreihe fügte nun Cantani den gewöhnlichen Nährböden Substanzen hinzu, die „vermutlich als die Hauptbestandteile der angewendeten organischen Flüssigkeiten" anzusehen wären. Dabei fand er, daß verschiedene Albuminkörper einen ziemlich günstigen Einfluß auf das Influenzabacillenwachstum ausübten. Reines koaguliertes Eieralbumin wirkte wenig günstig, Eidotter mit Agar desgleichen, besonders gut war Serumalbumin, sowie reines Hämoglobin und Oxyhämoglobin. Hämatin war ohne Einfluß, dagegen wirkte Globulin erheblich fördernd. Deshalb nimmt Cantani an, daß das Globulin die fördernde Substanz im Hämoglobin sei. Auf cholestearinhaltigem Agar erfolgte nur spärliches Wachstum, besser auf Mucinagar. Ebenso besaßen Protalbumose, Disalbumose und Hämalbumose wachstumsfördernde Eigenschaften, während Nutrose und Somatose, ähnlich wie Hämatin, kein Wachstum ermöglichten. Cantani ging nun daran, aus dem Blute durch künstliche Digestion einen Nährboden zu gewinnen, indem er eine ziemlich große Menge Blut bei Zusatz von Pepsin und Salzsäure einige Tage im Brütschranke hielt, nachher filtrierte, schwach alkalisierte, einige Minuten kochte und wieder abfiltrierte. Er erhielt eine goldgelbe, transparente Flüssigkeit, die beim Kochen nicht mehr gerann, eine schöne Biuretreaktion gab und außerordentlich fördernd für das Wachstum des Influenzakeimes war. Doch schon „nach einigen Tagen" verlor diese Flüssigkeit ganz und gar ihre wachstumsermöglichende Eigenschaft.

In einer dritten Versuchsreihe studierte Cantani den Einfluß verschiedener Bakterien als Nährbodenzusatz auf das Wachstum des Influenzabacillus. Er fand nun, daß gewisse Bakterien (Gonococcus, Diphtheriebacillus u. a.) auch auf solchen Nährböden, auf welchen Influenzabacillen allein nicht wachsen (Agar), das Wachstum dieser ermöglichten, wenn sie lebend mitgeimpft wurden. Influenzabacillenwachstum erfolgte aber nur dort, wo sich das zugesellte Bakterienmaterial befand. Noch günstiger waren die Resultate, wenn ein albuminreiches

Nährsubstrat verwendet wurde, Ascites- oder Blutglycerinagar (auf letzterem ging der Influenzabacillus allein nicht an). Am besten wirkten bei diesen Versuchen der Micrococcus gonorrh. und der Diphtheriebacillus, dann Staphylococcus pyogenes und einige nicht pathogene Arten, gar nicht Diplococcus pneumoniae und Streptococcus pyog.

In einer vierten Versuchsreihe endlich setzte Cantani sterilisierte (3 Stunden bei 60°) Aufschwemmungen verschiedener Bakterien verflüssigtem und abgekühltem Agar zu (meist je 1 Agarkultur), und es zeigte sich, daß auch sterilisierte Bakterien, pathogene wie nicht pathogene Arten, Wachstum des Influenzabacillus ermöglichten. Sterilisierung bei 100° gab keine so guten Resultate. Auch wurde darauf geachtet, das so hergestellte Material noch denselben Tag zur Impfung zu verwenden, da oft schon durch 24-stündiges Stehen keine Wirkung mehr nachweisbar war. Cantani nimmt es als wahrscheinlich an, daß die in den Bakterienleibern enthaltenen Albuminkörper dabei die wirksame Substanz abgeben.

Aus den im Vorhergehenden vielfach ausführlicher mitgeteilten Arbeiten geht hervor, daß in gewissen biologischen Fragen über den von R. Pfeiffer entdeckten Influenzabacillus noch einige Unklarheiten herrschen, ja daß nicht einmal die so wichtige Frage mit Sicherheit entschieden ist, ob der Influenzabacillus für sein Wachstum in der Kultur unbedingt bluthaltige Nährböden benötige oder nicht. Dies gab die Veranlassung zu den nachfolgenden Untersuchungen.

Wir begannen diese Untersuchungen mit der Prüfung, ob die Reaktion des Nährbodens für das Gedeihen des Influenzabacillus von irgend einem Einflusse sei. Dabei ergab sich in völliger Uebereinstimmung mit den Angaben Grassberger's, daß der Influenzabacillus allein, in Abwesenheit fördernder Bakterien, bedeutendere Schwankungen in der Reaktion des Nährbodens nicht verträgt. Sind jedoch gleichzeitig wachstumsfördernde Bakterien anwesend, so scheint eine höhere Alkalescenz, ja sogar ganz schwache saure Reaktion des Agars völlig indifferent zu sein. Als fördernden Keim verwendeten wir dabei hauptsächlich Staphylococcus pyogenes aureus, der von den leicht erhältlichen Arten die wachstumsfördernden Stoffe für den Influenzabacillus in besonders reichlichem Maße enthält.

Bei der Prüfung verschiedener anderer Keime auf diese wachstumsfördernde Eigenschaft bemühten wir uns auch, die diesbezüglich mitgeteilten Versuche von Cantani zu wiederholen. Es gelang uns jedoch nicht, in allen Versuchen dieselben Resultate zu erzielen. So giebt Cantani an, daß Gonokokken und Diphtheriebacillen, in reichlichen Mengen auf den gewöhnlichen, mit Influenzabacillen beschickten Agar gestrichen, ohne Anwesenheit von Blut Influenzabacillenwachstum ermöglichen sollen. Auch soll, gleichfalls auf einfachem Agar, Influenzabacillenwachstum erfolgen, wenn dem flüssigen Agar die abgetötete Aufschwemmung einer Kultur des Staphylococcus pyogenes oder anderer Bakterien in Wasser beigegeben und mitgegossen wurde. Trotz mehrmaliger Wiederholung dieser Versuche war es uns unmöglich, dabei Influenzabacillenwachstum zu erzielen. Allerdings wäre es noch möglich gewesen, das Wachstum der Influenzabacillen auf einfachem Agar bei Anwesenheit von Gonokokken in den Versuchen Cantani's darauf zurückzuführen, daß mit den Gonokokken zugleich Spuren von Hämo-

globin mitübertragen wurden. Diese Annahme hatte deshalb eine gewisse Wahrscheinlichkeit für sich, weil Cantani hervorhebt, nur mit großen Mengen lebender Gonokokken gearbeitet zu haben und weil es ja kaum möglich sein dürfte, das für die Gonokokkenkultur notwendige Serum vollständig hämoglobinfrei zu gewinnen. Dieser Ueberlegung folgend, verwendeten wir daher bei den oben erwähnten Versuchen verschiedene Gonokokkenstämme, sowohl solche, welche nur auf serumhaltigem Agar gediehen, als auch solche, welche in einigen Generationen immer wieder auf gewöhnlichem Agar weitergezüchtet werden konnten, eine Thatsache, die für den Micrococcus gonorrhoeae durch eine Reihe einwandfreier Beobachtungen sichergestellt ist. Aber auch so versagte das Influenzabacillenwachstum. Dabei waren auch die Gonokokken, welche bislang nur auf serumhaltigen Nährböden fortgezüchtet waren, zu Grunde gegangen und nur die angegangen, die dem gewöhnlichen Agar angepaßt waren.

Versuche mit dem Bacillus der Diphtherie und dem Staphylococcus pyogenes ergaben dasselbe negative Resultat: weder lebend mitgeimpft noch als abgetötete Kulturaufschwemmung mit dem Agar mitgegossen, vermochten sie den gewöhnlichen Agar für das Wachstum der Influenzabacillen tauglich zu machen.

Diese Beobachtungen, die demnach den Versuchen Cantani's widersprechen, veranlaßten uns, auch einige andere Angaben von Cantani zu überprüfen. Den Versuch, Influenza auf reinem, vollständig hämoglobinfreiem Serum zu züchten, konnten wir leider nicht ausführen, da es sehr schwierig ist, steriles, hämoglobinfreies Serum zu erhalten. Genügt ja doch die geringste Spur Wasser, welche ins Blut gelangt, um rote Blutkörperchen zu zerstören und ihren Farbstoff der ganzen Flüssigkeitsmenge mitzuteilen. Der Zutritt von Wasser zum Blute dürfte aber schwierig zu verhindern sein, soll das Blut dabei steril bleiben. Denn das für die Blutaufnahme bestimmte Gefäß müßte für diesen Zweck nicht bloß während des Blutaufsaugens auf Bluttemperatur erhalten werden, um zu vermeiden, daß das durch Verdunstung aus dem Blute sich abscheidende Wasser als Tau an den Wänden des Gefäßes sich niederschlage und dann herabrinne, sondern außerdem noch mit Blut bis zum Deckel angefüllt werden, da sonst durch die ungleiche Abkühlung des mit Blut gefüllten und des leeren Teiles des Gefäßes wieder Taubildung entsteht. Um aber mit Hilfe des Spektroskopes sehr kleine Mengen von Blutfarbstoff konstatieren zu können, bedarf es längerer Uebung, und selbst solche Mengen von Hämoglobin, welche spektroskopisch ohne Hydrazinzusatz nicht mehr nachweisbar sind, vermögen noch Influenzabacillenwachstum zu ermöglichen, wie wir uns wiederholt durch einschlägige Versuche überzeugen konnten. Wir können daher Cantani nicht beistimmen, wenn er im Vertrauen auf die spektroskopische Untersuchung die Hämoglobinfreiheit eines Nährbodens behaupten will.

Ebenso war es uns nicht möglich, auf blutfreiem Sperma Influenzabacillen wachsen zu sehen. Das Sperma war in unseren Versuchen ab vivo per vias naturales gewonnen und enthielt nur wenige fremde Keime, die nicht näher bestimmt wurden, sich aber bei der Prüfung auf Platten mit bluthaltigem Agar als Förderer für das Influenzabacillenwachstum erwiesen. Nicht einmal in der Nähe dieser Keime — sie lagen stets einzeln, 10—20 auf einer Platte — war von Influenzabacillenwachstum die geringste Spur zu bemerken. Es dürfte daher bei

den diesbezüglichen Versuchen Cantani's mit Sperma und Hodensaft vom Stier doch vielleicht die unfreiwillige Mitnahme von etwas Blut sich nicht haben vermeiden lassen.

Eingehender beschäftigten wir uns mit den Züchtungsversuchen auf künstlich verdautem Blute. Wir hielten uns dabei bezüglich der Darstellung an die genauen Angaben von R. v. Zeynek in Hoppe-Seyler's Zeitschr. f. phys. Chem. Bd. XXX. 1900. Heft 1 u. 2 als Verfahren zur Herstellung von Hämatin. Mit der Flüssigkeit, welche Cantani dabei als so besonders günstigen Influenzabacillennährboden rühmt, hatten wir keinen Erfolg, wenn die Blutmasse 14 Tage im Brütkasten bei 37° gestanden war. Versuche, das Blut für die Verdauung nur „einige Tage“ im Brütschranke zu halten, haben wir bisher noch nicht ausgeführt, es ist jedoch sehr wahrscheinlich, daß vor Beendigung der Umsetzung auch das Filtrat — wie es Cantani angiebt — das Wachstum der Influenzabacillen ermöglicht. Genauer haben wir uns nun mit dem Niederschlag auf dem Filter zu befassen.

Bei der Ueberprüfung der Arbeit Cantani's hatten wir auch die Versuche derselben mit Hämatin wiederholt und dazu vom Herrn Docenten Dr. R. v. Zeynek, dem wir überhaupt für seine große Liebenswürdigkeit den besten Dank schulden, Hämatin verschiedener Provenienz erhalten. Schon gewöhnliches Hämatin (Nencki-Chalfejew) ist, zwar nicht allein, wohl aber bei Beigabe eines fördernden Keimes für Influenzabacillen, ein geeigneter Nährboden. Grassberger, der auf Hämatin mit Staphylokokken gleichfalls positive Resultate erhalten hatte, macht keine Angaben über die Darstellungsweise des verwendeten Hämatins. Weit besser jedoch gedeiht der Influenzabacillus auf dem durch Verdauung gewonnenen Hämatin. Löst man etwas von diesem Hämatin, das wir fernerhin mit „H_1“ bezeichnen wollen — nicht bloß aus Bequemlichkeitsgründen, sondern auch deshalb, weil es sich chemisch, nicht aber spektroskopisch von dem gewöhnlichen Hämatin (Nencki-Chalfejew) unterscheidet — mittels etwas Soda im Wasser unter Kochen auf, so erhält man eine schwarzgrüne, klare Flüssigkeit, haltbar, beim Kochen nicht gerinnend, daher beliebig oft durch einfaches Aufkochen sterilisierbar. Diese Flüssigkeit, in geringer Menge dem verflüssigten Agar zugesetzt oder auf dem erstarrten Agar ausgestrichen, ermöglicht bei gleichzeitiger Anwesenheit gewisser fördernder Keime, gleichgiltig ob lebend mitgeimpft oder als abgetötete Aufschwemmung mitgegossen, ein überaus üppiges Influenzabacillenwachstum, üppiger als auf allen anderen versuchten Nährböden.

Die Darstellung von H_1 ist nicht sehr mühsam und ermöglicht die Erzeugung großer Mengen auf einmal, wobei es sehr zu statten kommt, daß H_1 ein überaus haltbarer Körper ist. Die ersten Proben, die wir davon verwendeten, waren $2^1/_2$ Jahre alt und ebenso gut, wie der später frisch dargestellte Körper. Aufbewahrt war er in trockener Form in einem Glasfläschchen. Wie lange die Lösung in Wasser mit Sodazusatz unverändert bleibt, wissen wir nicht. Im Laufe von 4 Monaten hatte sie sich nicht geändert. Die Darstellungsweise von H_1 geben wir nach R. v. Zeyneck wörtlich wieder:

„Der Verdauung wurden Lösungen von Oxyhämoglobinkrystallen aus Pferdeblut unterworfen. Sie waren aus einem Blutkörperchenbrei im Beginne der Fäulnis desselben dargestellt worden und wurden einmal umkrystallisiert. Die Konzentration der Oxyhämoglobinlösung betrug

etwa 5 Proz. Die klaren Lösungen wurden mit Sauerstoff gesättigt, hierauf mit soviel Salzsäure versetzt, daß der Salzsäuregehalt 0,2 bis 0,3 Proz. betrug; dann wurden sie mit einer Auflösung eines gut wirkenden Pepsinpräparates in 0,4-proz. Salzsäure versetzt und bei 36 bis 40° mehrere Tage sich überlassen. Die ursprünglich dünnflüssigen Blutfarbstofflösungen werden bald gallertig dickflüssig; bei mikroskopischer Betrachtung sieht man hellbraune Schollen, daneben kleine, schwarze Körner. Nach einiger Zeit wird die zersetzte Blutfarbstofflösung wiederum dünnflüssig. Als keine Konsistenzänderung mehr eintrat, wurde die Flüssigkeit mit 0,4-proz. Salzsäure stark verdünnt.

„Es setzte sich nun ein brauner Niederschlag zu Boden. Die über dem Niederschlage befindliche Flüssigkeit ist braun gefärbt, sie enthält nur sehr geringe, durch Ferrocyankalium nachweisbare Spuren von Eisen. Mit Ammoniak und Hydrazinhydrat färbt sie sich kirschrot und zeigt ein hämochromogenartiges Spektrum. Der Bodensatz ist nun ein feiner, brauner Schlamm von Hämatin [1]), dem wenig große, hellgelbe Schollen beigemengt sind. Um diese zu lösen, wurde der Hämatinschlamm mit 1-proz. Salzsäure verrührt, eine Abspaltung von Eisen, durch Ferrocyankalium nachweisbar, erfolgt dadurch nicht. Nachdem bei mikroskopischer Untersuchung dem Schlamme keine Schollen mehr beigemengt gefunden wurden, wurde der Schlamm durch Dekantation mit Wasser gut gewaschen, bis das Waschwasser neutral reagierte und ungefärbt blieb, hierauf auf einem Filter gesammelt. Das so erhaltene Hämatin löst sich wenig in Weingeist, leicht in verdünnten Alkalien. Die Lösungen haben das typische Aussehen von Hämatinlösungen, auf Zusatz von Hydrazinhydrat wird das Hämochromogenspektrum sehr schön erhalten.“

Um sicher zu sein, daß das dargestellte Hämatin wirklich eine analysenreine Substanz ist, hat R. v. Zeynek daraus Häminkrystalle hergestellt und damit die Elementaranalyse ausgeführt: „Die Analysenwerte entsprechen etwa einer Formel $C_{34}H_{34}N_5FeClO_4$. Es sind demnach hier Hämatinkrystalle erhalten worden, welche dem Hämatin Hoppe-Seyler's wie Mörner's ähnlich zusammengestellt sind, mit Ausnahme des höheren Stickstoffgehaltes, welcher einem Plus an einem Stickstoffatom im Molekül entspricht.“

Dies die ursprüngliche Darstellung. Für unsere Zwecke, bei welchen es mehr auf leichte und einfache Darstellungsweise als auf absolute chemische Reinheit ankommt, hat sich folgendes Verfahren als empfehlenswert erwiesen: 100 g krystallisiertes Oxyhämoglobin vom Pferde werden mit 3—5 l 0,4-proz. HCl und der nötigen Menge Pepsin (2—3 g Merck 1 : 4000) durch mehrere (4—5) Wochen bei 37° gehalten. Der Niederschlag wird filtriert, zuerst mit 1-proz. HCl, hierauf mit destilliertem Wasser gut gewaschen, abgepreßt und wasserfreiem, über Na destilliertem Aether mehrfach bei Zimmertemperatur extrahiert.

Durch Verwendung dieses Körpers H_1 als Nährbodenzusatz war nun einerseits die reine Weiterzüchtung des Influenzabacillus sehr erleichtert, andererseits war dadurch die Möglichkeit geboten, in einfacher und sicherer Weise jene Bakterien ausfindig zu machen, welche als fördernde Keime für das Wachstum der Influenzabacillen in Betracht kommen, denn ohne Zusatz eines der sonst wachstumfördernden, hier Wachstum bedingenden Bakterien ist auf dem H_1-Agar absolut kein

1) = „H_1“.

Influenzabacillenwachstum zu erzielen. Da wir beobachteten, daß jene Mikroorganismen, welche lebend die Influenzabacillen günstig beeinflussen, dies sämtlich auch im abgetöteten (Aufkochen über der Flamme je nach der verwendeten Aufschwemmung bis zu ca. 15 Minuten) Zustande thun, so war es ein leichtes, nunmehr alle beliebigen Bakterien diesbezüglich zu prüfen. Ein Ueberwuchern der fremden Bakterien war nun ausgeschlossen und bei den kärglich wachsenden Bakterien durch Zusatz mehrerer Kulturaufschwemmungen zum Nährboden dieselbe Masse an Bakterienleibern und deren Produkten zu erzielen wie bei den üppig wachsenden. Den Bakterienzusatz nahmen wir in der Weise vor, daß wir den auf schiefem Agar durch 24—48 Stunden gewachsenen Bakterienrasen abschabten, in 1,5—2 ccm Wasser aufschwemmten, durch 1/4 Stunde kochten und nunmehr davon entweder einige Tropfen (2—3) auf die Oberfläche des H_1-Agar strichen oder 0,5—1 ccm davon dem flüssigen H_1-Agar beisetzten. Oder aber wir legten von den zu untersuchenden Keimen Fleischbrühekulturen an, kochten diese nach 24—48-stündigem Wachstum auf und setzten davon dem flüssigen H_1-Agar zu. Dabei machte sich nun der Nachteil bemerkbar, daß von den Fleischbrühekulturen stets ziemlich viel zugesetzt werden mußte. So war z. B. bei einem Zusatz von 0,5—1,5 ccm abgetöteter Staphylokokken-Fleischbrühekultur das Wachstum recht kärglich und wurde erst bei einem Zusatz von 1,5 ccm aufwärts üppiger. Als Zeit der Beobachtung wurden stets 48 Stunden gewählt. Eine längere Beobachtungszeit schien deshalb unthunlich, weil es ja dabei zu vermeiden galt, daß sich andere fremde Keime auf den H_1-Platten entwickeln, da dadurch die Platte für die Beurteilung wertlos wurde. Daß es dabei von Bedeutung sei, die abgetöteten Kulturen an demselben Tage, an dem sie getötet wurden, zu verwenden und nicht mehr in den folgenden, konnten wir in Uebereinstimmung mit Grassberger's Angaben nicht regelmäßig finden. Unsere Versuche darüber sind jedoch noch nicht abgeschlossen. Manchmal gingen wir schließlich auch so vor, daß wir die schiefen Agarröhrchen, auf denen die „Zusatzkeime" gewachsen waren, samt dem Kulturrasen oder, wenn dieser schon anderweitig verwendet wurde, nachdem er abgeschabt war, einfach im Wasserbade durch 20 Minuten bei 100° hielten, dann einige Tropfen H_1-Lösung zusetzten und dann ausgossen. Stets erhielten wir auch auf diesen Platten üppiges Influenzabacillenwachstum.

Die Menge des Zusatzes von H_1 spielt keine Rolle, wir gaben auf ein Agarröhrchen meist 6—10 Tropfen einer 1-proz. Lösung von H_1. Zu reichliche Beigabe erwies sich als weniger günstig, ebenso ein zu geringer Zusatz.

Von einem gewissen Einfluß ist dabei auch die Menge der aufgestrichenen Aufschwemmung des abgetöteten fördernden Keimes, während bei der mitgegossenen Aufschwemmung nennenswerte Wachstumsdifferenzen bei reichlicherem oder kärglicherem Zusatz nicht zu bemerken waren. Dies dürfte sich daraus erklären, daß durch das reichliche Aufstreichen der abgetöteten Bakterienaufschwemmung die oberste Agarschicht mit den in Betracht kommenden bakteriellen Stoffen weit mehr durchtränkt wird, als wenn ein gewisses Quantum dem flüssigen H_1-Agar zugesetzt wird.

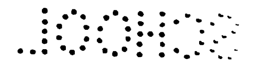
Aus diesem H_1-Nährboden mit den fremden abgetöteten Keimen erhielten wir regelmäßig Riesenwachstum. Besonders große und schöne Influenzabacillenkolonieen zeigten sich, wenn von der Influenzabacillen-

Kochsalzaufschwemmung wenig zur Aussaat genommen wurde, so daß die Keime möglichst isoliert auf der Platte zur Entwickelung gelangten. Dadurch erzielten wir Kolonieen, von welchen einzelne bis zu $^1/_2$ cm im Durchmesser aufwiesen. Das Impfen der Platten geschah dabei in der Weise, daß wir von einer höchstens 48-stündigen Influenzabacillenkultur (H_1-Agar gegossen) je nach der Menge der zu impfenden Platten 1—2—3 Oesen der Kultur in Kochsalzlösung aufschwemmten und dann davon mit dem Platinspatel in 3 Strichen auf der Platte aussäten. Wurden lebende Keime mitgeimpft, so gelangten diese nur an dem einen Ende der Striche in Punktform zur Aussaat (2 Punkte zwischen den 3 Strichen). Dadurch war die Beeinflussungszone sehr deutlich zu sehen und bei Verwendung trockener Platten, was jederzeit leicht erreichbar ist, erfolgte niemals Ueberwuchern durch die fremden Keime. Die Beeinflussung durch lebende fremde Keime beobachteten wir, namentlich wenn sie Neigung zur Ueberwucherung zeigten, auch in der Art, daß wir den betreffenden Keim auf der trockenen Platte in Punktform oder in Strichform impften, nach 24-stündigem Wachstum oder früher den Agar in einem Umkreis von 2—3 mm rings um die Kolonieen ausschnitten und den dadurch erhaltenen Agarcylinder mit der fremden Kolonie entfernten. Bei Beschickung der so vorbereiteten H_1-Platten mit Influenzabacillen zeigte sich bei fördernden Keimen rings um die ausgeschnittenen Stellen üppiges Wachstum der Influenzabacillen. Die Beeinflussungszone schwankte zwischen $^1/_2$—1—$1^1/_2$ cm und darüber, doch war begreiflicherweise das beste Wachstum am Rande der ausgeschnittenen Stelle.

Die Untersuchung über die Beeinflussungsfähigkeit dehnten wir aut eine größere Anzahl von Mikroorganismen aus, insonderheit auf diejenigen pathogenen Arten, die häufig mit dem Influenzabacillus vergesellschaftet vorgefunden werden. Es wurden dazu unter anderem verwendet: Staphylococcus pyogenes, Streptococcus pyogenes, Diplococcus pneumoniae, Bacillus diphtheriae, Micrococcus catarrhalis, Micrococcus gonorrhoeae, Micrococcus meningitidis c. sp. u. a.

Bei Betrachtung der so merkwürdigen Erscheinung, daß das Wachstum der Influenzabacillen auf H_1-Nährböden unbedingt die Anwesenheit fördernder Keime, sei es abgetötet oder lebend, erfordert, drängt sich in erster Linie die Frage auf: Worauf beruht der Einfluß der fördernden Keime? Jedenfalls müssen es chemische Stoffe sein, entweder enthalten in den Bakterienleibern, welche das Influenzabacillenwachstum ermöglichen, oder entstanden durch die Einwirkung der fremden Keime auf den Nährboden, da ja sowohl durch das Abtöten als durch das Ausschneiden der Kolonie jedwede begünstigende Aeußerung der Lebensthätigkeit der fördernden Keime ausgeschlossen war. Diese Stoffe sind in hohem Grade diffundierend, ertragen eine Temperatur von 100° und sind gewiß organischer Natur, da es uns nicht gelang, durch Zugabe der aufgelösten Staphylokokken-Asche Wachstum zu erzielen.

Nun versuchten wir verschiedene Körper, welche Bestandteile des Bakterienleibes sein sollen, wie Milchsäure, Glykogen etc. Keine dieser Substanzen ermöglichte Influenzabacillenwachstum. Dann gingen wir daran, aus großen Bakterienmassen verschiedene Stoffe darzustellen, und sind eben mit der Untersuchung darüber beschäftigt. Ob sich dabei ein Resultat ergeben wird, ist bei der geringen Kenntnis, die über das Wesen derartiger Körper herrscht, wohl sehr zweifelhaft.



Es handelt sich nun um die Frage, ob diese Stoffe in der Weise auf den Nährboden einwirken, daß sie die H_1-Lösung umsetzen, oder ob dabei ein Körper zugeführt wird, der im Verein mit der unveränderten H_1-Lösung Influenzabacillenwachstum bewirkt, also eine Summation eintritt. Die Erscheinung, daß ein zu reichlicher Bakterienzusatz sich eher als entwickelungshemmend erweist, läßt den Schluß zu, daß entweder verschiedene, in den Bakterien enthaltene Körper einen teils hemmenden, teils fördernden Einfluß auf Influenzabacillen ausüben, oder daß der fördernde Stoff sich nur in einer gewissen Verdünnung besonders wirksam erweist. Gegen die letztere Annahme spricht nur der Umstand, daß gerade in der nächsten Umgebung einer Kolonie, wo also die Konzentration, wenn man bei so verschwindend kleinen Quantitäten überhaupt von einer Konzentration sprechen darf, das Wachstum am üppigsten ist und gegen den Rand des Beeinflussungskreises hin abnimmt. Irgend eine Umsetzung des H_1-Agars bei Zusatz der Bakterienaufschwemmung war auf keine Weise chemisch nachweisbar — begreiflicherweise, wenn man bedenkt, daß die an und für sich so geringe Menge des in den Bakterien vorhandenen Stoffes, den eine Staphylokokkenkolonie von z. B. 2 mm Durchmesser produziert, in einem Kreise mit dem Durchmesser 1,5 ccm diffundiert.

Während dieser Stoff auf Blutagar nach R. Pfeiffer das an und für sich stattfindende Influenzabacillenwachstum nur begünstigt, ist er auf den H_1-Agarplatten für das Wachstum des Influenzabacillus unbedingt erforderlich und vermag doch allein auf einfachem Agar Influenzabacillen nicht zum Wachstum zu bringen. Nur zusammen mit einem Bestandteil des Hämoglobins zeigt er Wirksamkeit, gleichgiltig ob derselbe im frischen Zustande, wie im Blute, oder in anderer Form dem Nährboden zugesetzt wird.

Das Hämoglobin allein ermöglicht Influenzabacillenwachstum sowohl im frischen Blute als auch, wie schon R. Pfeiffer beobachtete, in durch Kochen geronnenem Blute. Auch wir haben darüber eine Reihe von Versuchen angestellt, sind damit jedoch noch zu keinem völligen Abschlusse gelangt, da manche Darstellungen längere Zeit erfordern. Zum ersten Male verwendeten wir R. Pfeiffer's Mitteilung, als sich unser Blutvorrat, den wir anfangs zum Weiterzüchten der Influenzabacillen benützten, als nicht mehr steril erwies und wir rasch Blut benötigten. Wir kochten das Blut mit einigen Kubikcentimetern Wasser auf und bestrichen mit der nun erhaltenen Flüssigkeit, in der zahlreiche Flocken geronnenen Eiweißes, durch Hämoglobin braun gefärbt, schwammen, den Agar. Influenzabacillen wuchsen allein etwas schlechter wie auf gewöhnlichem Blute, im Vereine mit Staphylokokken ebenso gut. Filtrierte man das mit Wasser gekochte Blut, so erhielt man eine trübe Flüssigkeit, welche ebenfalls Influenzabacillenwachstum ermöglichte. Nun setzten wir Normalsodalösung dem Blute zu und kochten damit auf. Es entstand eine klare, fast schwarze Lösung, die, auf Agar gestrichen, gleichfalls Influenzabacillen angehen ließ, und zwar üppiger und besser als das mit Wasser allein gekochte Blut. Gab man von der Blutlösung in Soda 1—2 ccm in verflüssigten Agar, so zeigten die damit gegossenen Platten auch Influenzabacillenwachstum, es hatte sich jedoch ein Niederschlag gebildet, der die Platten undurchsichtig machte. Filtrierte man den flüssigen Agar, dem das in Soda gekochte Blut zugesetzt war, so zeigte sich auf dem erstarrten Filtrat weder mit noch ohne Staphylokokkenzusatz eine Spur von Influenzabacillenwachstum.

Auf Grund dieser Beobachtung mußte geschlossen werden, daß in dem Niederschlag, der auf dem Filter zurückgeblieben war, sich die das Influenzabacillenwachstum ermöglichende Substanz vorfindet und wir erhielten auch, sobald der Niederschlag den Agarplatten zugesetzt war, wieder Influenzabacillenwachstum. Dasselbe erstreckte sich jedoch nicht nur auf die Stellen, an denen der Niederschlag im Agar eingebettet war, sondern auf die ganze Platte, auch dorthin, wo gar keine Niederschlagsflocken zu sehen waren. Es mußte also der in Betracht kommende, im Niederschlag enthaltene Stoff sich bei längerem Verweilen im Agar wenigstens teilweise lösen. Wir verflüssigten nun Agar, setzten in Soda gelöstes, aufgekochtes Blut zu, verteilten durch Schütteln den nun entstandenen Niederschlag möglichst gleichmäßig in dem Agarröhrchen, ließen den Agar dann so erstarren und durch mehrere (4—6) Tage stehen. Hiernach wurde er wieder verflüssigt, abfiltriert und mit dem Filtrat gossen wir Platten. Diese Platten zeigten genau dasselbe Verhalten wie jene, welche mit Zusatz des Körpers H_1 gegossen wurden: Bei Zusatz eines fremden fördernden Keimes um diesen herum üppiges Influenzabacillenwachstum, in weiterer Entfernung desselben und ohne fremde Keime kein Wachstum.

Diese Art der Darstellung des Nährbodens zur Züchtung der Influenzabacillen dürfte sich in Hinkunft einstweilen als die beste, weil einfachste, erweisen: Eine größere Menge Blutes ohne Serum wird mit Normalsodalösung in hinreichender Menge versetzt und gekocht und die heiße Blutlösung einem entsprechenden Quantum auf gewöhnliche Weise dargestellten, verflüssigten Nähragar zugesetzt, diese Mischung wird nun tüchtig durchgeschüttelt, so daß der entstandene Niederschlag sich nicht zu Boden setzt, sondern beim Erstarren in der Agarmasse ziemlich gleichmäßig verteilt ist. Das erstarrte Gemisch läßt man nun längere Zeit (1—3 Wochen) stehen, verflüssigt dann wieder, filtriert durch Watte, füllt in Eprouvetten ab und sterilisiert diese im Dampfsterilisator. So erhält man einen größeren Nährbodenvorrat, geeignet sowohl zur Züchtung von Influenzabacillen als auch anderer Bakterien, der sich, ohne Schaden zu nehmen, lange aufbewahren läßt und durch gewöhnliches Verflüssigen der Röhrchen sofort gebrauchsfähig ist. Natürlich muß bei längerer Aufbewahrung durch geeigneten Verschluß ein zu starker Wasserverlust durch Verdunstung vermieden werden.

Sowohl dieser Nährboden als auch der durch Zusatz von H_1 gewonnene eignet sich zur Isolierung und Züchtung des Influenzabacillus zumindest ebenso gut als der ursprünglich von R. Pfeiffer und der von Voges angegebene. In Bezug auf Ueppigkeit der Kolonieen übertrifft er jedoch beide. Wir hatten in keinem Falle, in dem es sich um den kulturellen Nachweis von Influenzabacillen handelte, damit einen Mißerfolg, ja in einigen Fällen, in welchen das gewöhnliche Verfahren versagt hatte, erfolgte auf den Hämatinnährböden üppiges Wachstum. Der bei Verwendung der beiden von uns angegebenen Nährböden nötige Zusatz eines fremden fördernden Keimes ist in praxi nicht unter allen Umständen erforderlich, da ja bei Züchtung von Influenzabacillen aus dem Sputum z. B. fast stets fördernde Keime mit ausgesät werden. Es bedeutet aber auch keine Mehrarbeit im Vergleiche zum gewöhnlichen Verfahren, weil wir der Sicherheit wegen auch bei diesem, wenn es sich um eine Züchtung mit sicher positivem Resultate handeln soll, fremde fördernde Keime mitsäen sollen. Will man die Gefahr, daß die Platte von dem mitgeimpften Hilfskeime überwuchert werde — was

übrigens nur bei besonders feuchter Oberfläche erfolgen könnte — sicher vermeiden, so ist es empfehlenswert, an Stelle lebender Keime einige (2—3) Tropfen einer abgetöteten Kulturaufschwemmung von Staphylococcus pyogenes oder Bacillus diphtheriae etc. in Wasser auf der Oberfläche der Platte zu verteilen. Es genügt dazu, 3—4 Oesen voll einer der angegebenen Bakterien in 1 ccm Wasser aufzuschwemmen und diese Aufschwemmung einige Male über der Flamme aufkochen zu lassen. Es empfiehlt sich, diese Aufschwemmung im Bedarfsfalle täglich frisch herzustellen, da diese üppiger wachstumsfördernd wirkt als ältere (3—4 Tage) Aufschwemmungen, die auch nicht mehr regelmäßig diesen fördernden Einfluß zeigen. Legt man keinen Wert auf die Durchsichtigkeit des Nährbodens, so ist es bequem, den Agar, welchem — wie oben angegeben — in Soda gelöstes Blut beigesetzt wurde, sofort unfiltriert in Eprouvetten zu verteilen, wobei nur darauf zu achten ist, daß auch in jedem Röhrchen ein entsprechendes Quantum des Niederschlages sich vorfindet. Im Bedarfsfalle werden die Eprouvetten verflüssigt und unfiltriert gegossen und zeigen nun ohne Zusatz eines fremden fördernden Keimes üppiges Influenzabacillenwachstum. Dieser Nährboden (mit dem Niederschlag) ist sofort nach der Herstellung derselben verwendbar, doch giebt auch er, wenn zwischen Herstellung und Verwendung 8—14 Tage verflossen sind, weit bessere Resultate. Wir haben derart dargestellte Nährböden bis $1^1/_2$ Monate aufbewahrt und hat derselbe innerhalb dieser Zeit in seiner Wirksamkeit nichts eingebüßt.

Bei der Erwägung, wieso es komme, daß in dem filtrierten Agar Influenzabacillen nur unter Beihilfe eines fördernden fremden Keimes zu wachsen vermögen, während der unfiltrierte Agar allein schon dies ermöglicht, scheint die Erklärung dafür in der Beobachtung Grassberger's gegeben, daß auch Influenzabacillen selbst wieder Influenzabacillenwachstum begünstigen. Während das Filtrat nach spektroskopischer Untersuchung nur Hämatin enthält, welches allein nicht imstande ist, Influenzabacillenwachstum zu ermöglichen, findet sich in dem unfiltrierten Agar im Niederschlag, wenn derselbe nicht länger als z. B. $1^1/_2$ Monate im Agar verweilt, entweder noch nicht umgewandeltes Hämoglobin — denn die Umwandelung des Hämoglobins in Hämatin geschieht zweifelsohne im Agar und nimmt bei längerem Verweilen im Agar zu — oder außerdem noch ein für das Influenzabacillenwachstum unentbehrlicher Faktor. Impft man nun eine Schale, in die Agar mit dem Niederschlage gegossen wurde, so ermöglicht primär das noch vorhandene Hämoglobin oder, wie erwähnt, eventuell noch ein anderer Stoff das Influenzabacillenwachstum. Die an den Stellen, wo sich der Hämoglobinkörper (resp. andere Stoff) im Niederschlage befindet, lagernden aufgestrichenen Influenzabacillen beginnen nun zu wachsen und äußern dabei ihre begünstigende Wechselwirkung auf die benachbarten Influenzakeime, die an den Stellen liegen, wo kein Niederschlag sich vorfindet, daher auf das reine Hämatin angewiesen sind, welches sich im Agar gebildet und gelöst hat, und die daher primär ohne „Hilfe“ nicht wachsen konnten. Nun entwickeln sich diese Keime sekundär, bleiben aber vor den primär entstandenen Kolonieen nicht nur nicht zurück, sondern überholen sie sogar, da ja Influenzabacillen gerade auf Hämatin zum Riesenwachstum neigen. Eine Erscheinung nur spricht gegen diese Annahme: Wir haben gesehen, daß auf reinen Hämatinplatten das Influenzabacillenwachstum nur in der bekannten Beeinflussungszone im Umkreise von ca. $1^1/_2$ cm um die mitgeimpften

Staphylokokken eintritt. Wenn nun Influenzabacillen wieder Influenzabacillenwachstum begünstigen, so wäre zu erwarten, daß sich mit der Zeit auch in den Teilen der aufgestrichenen Kultur, welche außerhalb des Beeinflussungskeimes liegen, Kolonieenbildung zeigen sollte. Das ist aber nicht der Fall. Es ist daher jedenfalls, wie schon Grassberger sagt, die Begünstigung durch Influenzabacillen selbst weit geringer als die durch Staphylokokken z. B., und es drängt sich die Vermutung auf, daß die von den Influenzabacillen gebildeten „Hilfsstoffe“ zu gering sind, um auf reinem Hämatinagar weiteres Influenzabacillenwachstum zu ermöglichen, während auf dem Agar, der auch den Niederschlag enthält, doch auch an anscheinend ganz freien Stellen befindliche kleinste Niederschlagsflocken den fördernden Bakterieneinfluß wieder zur Geltung gelangen lassen.

Aus dem früher Erwähnten erklärt sich auch, daß auf den Petri-Schalen, in welche Agar mit dem Niederschlag ausgegossen wurde, das Wachstum ein weit üppigeres ist, wenn der Agar mit dem Niederschlag nicht frisch, sondern erst einige Zeit nach der Darstellung verwendet wird, weil dann bereits mehr Hämatin sich gebildet hat. Wir sind eben mit den Versuchen beschäftigt, ob es möglich sei, durch sehr langes Verweilen des Niederschlages im Agar bei Brüttemperatur eine vollständige Umsetzung in Hämatin zu erzielen, so daß Influenzabacillen dann auch auf den mit dem Niederschlage gegossenen Agar als reinen Hämatinnährboden ohne Hilfe eines fördernden Keimes nicht mehr zu wachsen imstande sind. Diese partielle Umwandelung des Hämoglobins in Hämatin, welche durch höhere Temperaturen und längere Einwirkung des Agars erfolgt, dürfte unserer Ansicht nach auch das bessere Wachstum ermöglichen, welches Grassberger nach vorhergehendem Erwärmen des Blutes beobachtete, und wir können daher seiner Meinung, als ob die fördernde Wirkung durch Erwärmung des Blutes und die durch gewisse fremde Keime analoge Prozesse darstellen, nicht beipflichten.

Die Empfindlichkeit der Influenzabacillen ist nicht bloß auf Hämoglobin, sondern auch auf Hämatin eine bedeutende. Dies zeigt sich daraus, daß in Normalsodalösung gekochtes Blut auf die Agaroberfläche (Platte) gestrichen, sowohl mit als auch ohne fördernden Keim, stets weit üppigeres Wachstum erzeugt als einfach mit Wasser gekochtes Blut. Eine derartig bereitete Blutlösung vermochte noch nach 2 Monaten, in der Menge von 1—2 Tropfen auf die Oberfläche der Agarplatte gestrichen, üppiges Influenzabacillenwachstum hervorzurufen. Diese Blutlösung hat sich demnach als sehr praktische Vorratslösung erwiesen, um bei Mangel von sterilem Blut nicht in Verlegenheit zu sein.

Da aber jene Platten, in denen der Niederschlag mitgegossen wurde, auch ohne fremde Keime, und daher an jeder Stelle Influenzabacillenwachstum zeigten, so ergiebt sich daraus, daß die Influenzabacillenwachstum ermöglichende Substanz im Blute, welche in dem oben erwähnten Niederschlag enthalten erscheint, bei längerem Stehen in Agar entweder dort sich umsetzt zu einem dem Körper H_1 ähnlichen oder gleichen Produkt und als solches in dem alkalischen Agar teilweise in Lösung geht, oder daß die Influenzabacillenwachstum ermöglichende Substanz im Blute sich aus mehreren Komponenten, die sich auch wieder teilen können, zusammensetzt. In diesem Falle wäre die eine Komponente jene, welche auch im Körper H_1 enthalten ist und die in den Agar bei längerem Stehen überging, die andere die, welche in dem oben

erwähnten Versuche im Rückstande ungelöst geblieben ist und die möglicherweise auch in den Bakterienleibern enthalten scheint.

Unsere Versuche, das Entstehen des Niederschlages beim Zusatze von Na_2CO_3-Blut zu flüssigem Agar dadurch zu verhindern, daß wir die Kalksalze des Agars vor der Blutbeigabe in Phosphate umsetzten und abfiltrierten, zeigten keinen Erfolg. Ebensowenig gelang es, in dem Filtrat aus Fleischbrühe mit Na_2CO_3-Blut (es entsteht da auch ein Niederschlag), in welchem nach mehrtägigem Stehen dann Agar gelöst wurde, Influenzabacillenwachstum zu erzielen.

In unseren Versuchen verwendeten wir Menschen-, Pferde-, Rinder- und Hundeblut. Einen besonderen Unterschied im Influenzabacillenwachstum konnten wir dabei nicht beobachten. Es ist deshalb auch anzunehmen, daß in den Gallen verschiedener Provenienz, wenn diese rein überhaupt Influenzabacillenwachstum ermöglichen, kein Unterschied vorhanden sei. Wir prüften Bilirubin, Taurochol-, Cholal- und Glykokollsäure, alle einzeln und auch zusammen, sowohl auf einfachem als auch auf H_1-Agar, ohne fremde Keime, doch erhielten wir nirgends Wachstum. Auf die näheren Ergebnisse dieser Gallenversuche werden wir übrigens nochmals später zurückkommen.

Nachdruck verboten.

Zur Bakterienverdauung.

Zweite vorläufige Mitteilung.

Von Dr. **R. Turró**,
Vorstand des Laboratoriums der Academia de Ciencias médicas de Cataluña.

In meiner ersten Mitteilung über die Bakterienverdauung[1]) untersuchte ich die bakterientötende Wirkung des unter Abschluß der Luft in lösliche Substanz übergeführten Blutplasmas; in der vorliegenden Arbeit, welche jene vervollständigt, handelt es sich um das Bakterienlösungsvermögen des Schilddrüsen-, Nieren- und Muskelsaftes sowie des Hühnereies. Die Versuchstechnik ist dabei so einfach geworden, daß es ein Leichtes ist, die neugewonnenen Thatsachen nachzuprüfen.

I. Bakteriolytische Wirkung des Schilddrüsensaftes.

Zu meinen Untersuchungen verwende ich Schweineschilddrüsen, die, den Tieren noch am Schlachttage entnommen, zerschnitten und ausgepreßt werden; der erhaltene Saft wird filtriert und mit 2 Proz. Fluornatrium versetzt. In einem Glasröhrchen wird dann 1,00 ccm dieses Saftes mit 0,25 B. anthracis, die von einer am Tage vorher ausgesäten Gelosekultur abgeschabt worden sind, innig vermengt und bei 35—38° C in feuchter Kammer gehalten. Schon nach 3 Stunden kann man deutlich Bakterienlösungserscheinungen wahrnehmen. Ich untersuche folgendermaßen: Es wird etwas von der Mischung auf einen Objektträger gestrichen, fixiert und mit gesättigter wässeriger Enzianviolettlösung gefärbt, mit der Gram'schen Lösung behandelt, mit Weingeist entfärbt und mit wässeriger Eosinlösung nachgefärbt. Die Ba-

---

1) Centralbl. f. Bakt. etc. Abt. I. Bd. XXVIII. 1900. p. 173. — Revista trimestral de Ramón y Cajal. 1900.

cillen erscheinen von einer sehr weiten, futteral- oder kapselartigen, durchsichtigen Hülle umgeben, die gegen den rosigen Grund der Präparation absticht. Die meisten haben ihre violette Färbung behalten; einzelne jedoch sind durch den Alkohol entfärbt worden, wie wenn die Jodlösung keinerlei Einfluß auf sie ausgeübt hätte und haben sich mit Eosin gesättigt. Nach der kurzen Frist von 3 Stunden findet man, daß einige Bacillen eine Protoplasmaverdünnung aufweisen, als ob sie im Innern des Futterals zerschmölzen, und wirklich finden sich leere, farblose und lichtbrechende Kapseln ohne Spur von Protoplasma. Wenn man von 3 zu 3 Stunden von neuem untersucht, findet man die Bakteriolysis immer weiter vorgeschritten. Die Anzahl der anfangs unzählbaren Bacillen wird immer geringer; die meisten der übrig bleibenden nehmen die Gram'sche Färbung nicht mehr an, sondern sättigen sich mit der sauren; nur wenige behalten die violette Farbe. Auch die leeren Kapseln gehen der Auflösung entgegen. Nach 24 Stunden sind die Bacillen fast alle verschwunden; es bleibt kaum einer von Hunderttausend. Statt derselben findet man runde, stark verdünnte, eosinfarbige, mit einer runden Hülle umgebene Protoplasmamassen. Am 3. Tage sind mit dem Mikroskop weder Hüllen noch Bakterien aufzufinden; man sieht nur eine amorphe Substanz. Auf dem Boden des Röhrchens entdeckt man eine schleimige, klebrige, fadenziehende, schmutzig-graue Materie, die von dem darüberstehenden, rosenfarbenen Schilddrüsensafte deutlich absticht.

Die bakterienlösende Wirkung des Schilddrüsensaftes zeigt sich auch bei der gewöhnten Zimmertemperatur, die in unserem Laboratorium zwischen 5 und 18° C schwankt, nur ist sie viel langsamer, da erst nach 24 Stunden die Kapselbildung deutlich auftritt. Ebenso schwächt das Alter der Schilddrüse die Wirkung des Saftes ab, wie man deutlich erkennt, wenn man den Saft erst 4—8 Tage nach der Entnahme der Drüse bereitet. Der aus 3—4 Wochen alten Drüsen erhaltene Saft kapselt die Bakterien zwar noch ein, ist aber nicht stark genug, um sie zum Verschwinden zu bringen.

II. Bakterienlösende Wirkung des Muskelsaftes.

Der Muskelsaft wird ebenso bereitet wie der Schilddrüsensaft, und um der Fäulnis vorzubeugen, die seine Eigenschaften verändern würde, werden 2 Proz. Fluornatrium hinzugesetzt, was seine bakterienlösende Kraft nicht beeinträchtigt, wovon man sich durch Versuche überzeugen kann. Die aseptische Zubereitung hält recht schwer.

Wenn man einem bestimmten Gewicht Fleischsaft $^1/_4$ B. anthracis beimengt, so kann man nach wenigen Minuten beobachten, wie sich um die Bacillen herum eine höchst feine Hülle bildet, die sich manchmal wieder auflöst oder aber sich weiter entwickelt nach Art dessen, was wir beim Schilddrüsensafte gesehen haben. Mit oder ohne Kapsel (deren Vorhandensein etwas Accidentelles ist), nach 24 Stunden, bei einer Temperatur von 35—38° gehalten, findet man, daß die Anzahl der Bacillen um mehr als die Hälfte abgenommen hat und nach 2—3 Tagen gelingt es nur mehr, deren 3—4 in einem Gesichtsfelde zu entdecken, worin man sie vorher zu Tausenden sehen konnte.

Wenn wir dem Bakterienlösungsprozesse näher auf den Grund gehen, finden wir, daß die erste Veränderung, die das Bakterienprotoplasma kundgiebt, darin besteht, daß dasselbe, nach der Gram'schen Färbung und Eosinbehandlung mit Alkohol bespült, die violette Farbe

nicht zurückhält. Nach 1 Tage beobachten wir eine große Anzahl Bacillen, die die Gram'sche Färbung beibehalten, an demselben Faden sehen wir violett- und eosingefärbte. Die stärkere oder schwächere Durchtränkung mit der sauren Farbe ist ein Anzeichen der größeren oder geringeren Dichtigkeit des Protoplasmas resp. des Grades der Einschmelzung desselben. So sehen wir einerseits intensiv rosenfarbige Bacillen neben anderen nur sehr leicht gefärbten und andererseits nur mehr die unbestimmten Umrisse schon zerschmolzener Bacillen. Nach 24 Stunden hat die Anzahl der violetten Stäbchen beträchtlich abgenommen und am 3. Tage findet man nur noch vereinzelte Bakterien mit der einen oder der anderen Färbung; sie sind in ihrer Gesamtheit durch die lösende Wirkung der im Fleischsafte enthaltenen Enzyme geschmolzen worden. Als Residuum bleibt auf dem Boden des Röhrchens ein zäher Schleim übrig, dessen Kohäsion der des Hühnereiweißes ähnlich ist und den man mit einem Hakenstilett großenteils herausbekommt.

Hinsichtlich der bakteriolytischen Wirkung auf den Milzbrandbacillus scheint kein merklicher Unterschied zwischen Rindfleisch- und Schweinefleischsaft zu bestehen, wofern sie nur gleich frisch sind; beide Fleischsorten hören bald auf, einen wirksamen Saft zu geben.

III. Bakteriolytische Wirkung des Nierensaftes.

Aus der in dünne Scheibchen zerschnittenen Rindensubstanz der Schweineniere läßt sich eine kleine Menge eines sehr dicken, schwer zu filtrierenden Saftes auspressen, der stark zur Gerinnung neigt. Sein Bakterienlösungsvermögen ist dem des Schilddrüsensaftes gleich und die Veränderungen sind ganz analog: Zunächst Einkapselung, wobei der den Mittelpunkt der Hülle einnehmende Bacillus seine violette Färbung beibehält, dann folgt Verlust der Gram'schen Farbe und Durchtränkung mit Eosin; die 3. Phase besteht in vollständigem Verschwinden des Bacillus in der Kapselsubstanz und zuletzt kommt dann auch diese abhanden.

Um die Untersuchung der verschiedenen Stadien zu erleichtern, ist es zweckmäßig, dem Nierensafte etwas destilliertes Wasser zuzusetzen.

IV. Bakteriolytische Wirkung des Hühnereies.

Wenn man das Gelbe mit dem Weißen eines frischen Hühnereies innigst mittels eines Glasstäbchens vermengt unter Beobachtung aller aseptischen Maßregeln oder auch unter Zusatz von 2 Proz. Fluornatrium und 24 Stunden stehen läßt, findet man, daß sich die Mischung in einen dicken Bodensatz und einen flüssigen, darüberstehenden Teil geschieden hat. Wenn man nun zu einer bestimmten Menge dieser Flüssigkeit $^1/_4$ einer 1-tägigen Milzbrandbacillenkultur giebt und 24 Stunden bei geeigneter Temperatur stehen läßt, so findet man die Bacillen in völliger Auflösung begriffen. Alle zeigen sich eingekapselt; mit der Gram-schen Lösung behandelt, nehmen einige noch die violette Färbung an, andere schon nicht mehr und sättigen sich mit Eosin, während noch andere, wenn auch nur wenige, schon ganz in der Kapsel aufgegangen sind. Diese Erscheinungen schreiten derart fort, daß nach 3—4 Tagen weder von Kapseln noch von Bakterien etwas mehr zu sehen bleibt.

Auch das Eiweiß allein übt auf den Milzbrandbacillus bakteriolytische Wirkung aus. Nach 24 Stunden haben viele die Eigenschaft eingebüßt, sich violett zu färben und zeigen uns durch ihr größeres oder geringeres Aufsaugungsvermögen für Eosin den höheren oder niederen Grad ihrer Einschmelzung an, die in 3—4 Tagen zur Vollendung kommt.

Die Thätigkeit der Enzyme dieser Substanz läßt sich durch folgendes Verfahren steigern. Man öffnet das Ei an einem Pole und läßt das Weiße ausfließen, bis das Gelbe allein, in seine Membran gehüllt, zurückbleibt. Nun setzt man das Weiße in einem geschlossenen Gefäße der Brüttemperatur aus; nach einigen Tagen bemerkt man, daß sich Gerinnsel gebildet haben; man filtriert und erhält eine klare, durchsichtige, schwach gelbliche Flüssigkeit von Wasserkonsistenz, als ob sie eine Selbstverdauung erlitten hätte. Das Auflösungsvermögen dieser Flüssigkeit ist ungleich stärker als das des Eiweißes in natürlichem Zustande. Nach 16—24 Stunden bleibt kein Bacillus, der nach Gram färbbar wäre, der Alkohol entfärbt vollständig und die nachfolgende Eosinfärbung zeigt die Bacillen in voller Auflösung, breite Bänder Bacillensubstanz wie Schleimstreifen, die sich vom Eiweiß durch ihr Verhalten gegen die saure Farbe unterscheiden. Nach 2 Tagen ist die Auflösung vollständig. Auf dem Boden des Reagenzglases sammelt sich das Residuum dieser Verdauung und sieht wie ein graues, in Wasser untergetauchtes Sputum aus.

Wenn man nun ebenso das Verhalten des Dotters dem Milzbrandbacillus gegenüber untersucht, wird man mit Erstaunen gewahr, daß derselbe keine Wirkung auf das Bacillenprotoplasma auszuüben scheint; erst nach längerer Zeit kommt eine körnige Entartung mit Neigung zu Zerfall zum Vorschein.

Natürlich mußte man dieses ungewöhnliche Verhalten dem dicken Aggregatzustande des Dotters zuschreiben; aber eine Verdünnung mit destilliertem Wasser führte zu demselben Ergebnis; erst nach mehreren Tagen war ein körniger Zerfall zu beobachten und, nach Gram behandelt, färbten sich die Körner violett, während das umgebende Protoplasma eine rote Färbung annahm. Wenn man nun eine solche Dotteremulsion zur Förderung der Löslichkeit der Enzyme etliche Tage im Brütschranke stehen läßt, kommt die Dottersubstanz an die Oberfläche und das darunterstehende Wasser zeigt eine sehr schwach gelbliche Färbung. Das Filtrat bringt die Bacillen in 2—3 Tagen zur Einkapselung, ohne daß sie jedoch ihre Färbbarkeit nach Gram einbüßen.

Aus meinen Versuchen geht hervor, daß die Dotterenzyme im Wasser nur schwach löslich sind; ihr wirkliches Vorhandensein läßt sich jedoch leicht nachweisen, wenn man eine minimale Menge Dotter mit Eiweiß, das dessen natürliches Lösungsmittel zu sein scheint, mischt und diese Mischung bei Brüttemperatur hält; nach 4 Tagen findet man das Dotter aufgelöst. Wenn man nun vergleichende Versuche mit dieser Lösung und reinem Eiweiß anstellt, so ergiebt sich, daß, während letzteres 2 Tage braucht, um die Bacillen vollständig zur Lösung zu bringen, in ersterer schon nach 15—20 Stunden keine Spur von Bacillen mehr zur Beobachtung kommt.

Anfangs nahm ich zu meinen Untersuchungen über das Hühnerei jedesmal ein frisch gelegtes, da ich dasselbe, angesichts meiner Erfahrungen mit den verschiedenen Säften, für so am wirksamsten halten mußte. Zu meinem großen Erstaunen entdeckte ich dann, daß nach 20 bis 30 Tagen die bakteriolytische Kraft meines Untersuchungsmaterials statt abzunehmen, bedeutend zugenommen hatte. Für diese unerwartete Thatsache konnte ich erst eine befriedigende Erklärung finden, als ich bemerkte, daß die Dotterenzyme um so wirksamer werden, je löslicher sie geworden sind. Die bakteriolytische Kraft eines frisch gelegten Eies muß also verhältnismäßig schwächer sein, als die eines älteren.

V. Chemisches Zustandekommen der Bakteriolyse.

Wenn wir das Erscheinen der Kapsel um den vom Schilddrüsensafte angegriffenen Milzbrandbacillus mit den Augen verfolgen, überzeugen wir uns, daß derselbe inmitten der ihm gewordenen Hülle schwimmt. Fixieren wir nämlich auf einem Objektträger eine äußerst dünne Schicht einer Eiweißdottermischung und färben dieselbe mit Eosin. Auf diesen rosenfarbigen Grund bringen wir einen Tropfen Schilddrüsensaft, der in völliger Auflösung begriffene Bacillen enthält und lassen dann zwischen Deckglas und Objektträger Violettlösung einfließen. Das Gesichtsfeld wird durch den Farbstoff verdunkelt, bald aber hellt es sich wieder auf, die Bacillen erscheinen gefärbt und in der Richtung der Hauptachse der auf dem rosenfarbigen Grunde des Präparates sichtbaren Kapsel ausgestreckt, in deren Inneren man sie schwimmen und beim Klopfen an den Mikroskoptisch ihre Stellung verändern und zuweilen gar herausspringen sieht, so daß die Kapsel leer bleibt. Das alles beweist nun, daß der Inhalt der Kapsel, worin das Bacillenprotoplasma sich verwandelt hat, eine Substanz ist, welche der Farbstoff nicht mehr zum Gerinnen bringt, da sie schon durch vorausgehende Hydrolyse verflüssigt ist. Folgender Versuch scheint zu beweisen, daß die Verdauung des Bacillenprotoplasmas der Anhäufung einer großen Wassermenge zuzuschreiben ist. Man fixiere auf mehreren Objektträgern in voller Einkapselung begriffene Bacillen, und ohne sie zu färben, bringe man die einen in den Trockenschrank und andere in die feuchte Kammer und halte sie alle bei gleicher Brüttemperatur. Färbt man nun nach einigen Stunden, so findet man die ersteren ohne Kapsel und mit körnigem Protoplasma, während die letzteren noch unverändert sind. Man darf also wohl annehmen, daß die Kapsel ihr Wasser durch Verdunstung verloren hat und die körnige Veränderung des Protoplasmas eine Folge der von den Bacillen erlittenen Entwässerung ist.

Wenn nun die Verflüssigung resp. Bakteriolyse der Milzbrandbacillen der hydrolytischen Wirkung der sie angreifenden Enzyme zu verdanken ist, so wird es begreiflich, daß dieselben, wenn sie recht löslich und somit recht diffusibel sind, die Protoplasmamasse in ihrer Gesamtheit angreifen, wie etwa das Pepsin eine Fibrinfaser, und sie en bloc auflösen, während sie bei einem geringeren Diffusibilitätsgrade natürlicherweise den Bacillus nur an der Oberfläche packen und von dieser aus die Verflüssigung allmählich zustande bringen. Allbekannt ist der Vorgang der Auflösung der Milzbrandbacillen im Blutserum; die Protoplasmamasse wird nach und nach dünner, infiltriert sich immer schwächer mit den basischen Farben und verschwindet endlich gänzlich. Ebenso geschieht es mit dem Eiweiß: der Bacillus löst sich total auf und kurz vor seinem gänzlichen Verschwinden zeigt das Eosin denselben noch wie einen Schatten von dem, was er gewesen. Jedoch enthält der Schilddrüsen- resp. Nierensaft, durch Auspressen in grobem Zustande, die bakteriolytischen Enzyme nicht frei und diffusibel und daher greift er die Bacillen nur an der Oberfläche an und erzeugt so die Hülle, durch deren flüssige, vollkommen durchlässige Masse hindurch er seine Wirkung auf den Protoplasmakörper ausübt und denselben vollständig auflöst. So sehen wir, daß die bakteriolytische Kraft des Schilddrüsensaftes durch Verdünnung mit destilliertem Wasser auf $^1/_3$ oder $^1/_5$ abgeschwächt wird und kaum noch die Einkapselung der Bacillen bewirkt, sondern sie durch Granulierung und Fragmentierung auflöst. Wenn wir eine minimale Quantität Dotter in Eiweiß auflösen,

sehen wir, daß diese Flüssigkeit den Bacillus in seiner ganzen Masse angreift, und zwar um so stärker, je vollkommener die Lösung ist; wenn wir jedoch eine stärkere Lösung nehmen, geschieht die Bakteriolyse mittels Einkapselung. Beim Fleischsafte beobachtet man, daß derselbe die Bacillen bald einkapselt, bald nicht, je nach dem Fleische, von dem er herrührt, der Zeit, die verstrichen ist und anderen Umständen, die sich unserer Bestimmung entziehen und daher kapriciös scheinen.

Aus alledem geht hervor, daß bei dem Vorgange der Bakteriolyse die Kapselbildung etwas Accidentelles ist; das Wesentliche ist die Hydrolyse; das Uebrige sind nur verschiedene Weisen, wie diese sich vollzieht und die von dem größeren oder geringeren Löslichkeitsgrade der Enzyme abhängen.

Schließlich müssen wir noch bemerken, daß der Milzbrandbacillus durch vorheriges Erhitzen eine größere Widerstandsfähigkeit gegen die Bakteriolyse erlangt. In der Eiweißdotterlösung quillt er auf, bevor die Auflösung beginnt; in frischem Schilddrüsensafte tritt die Kapselbildung sehr verspätet ein, worauf dann der weitere Vorgang seinen natürlichen Verlauf nimmt; in älterem erfolgt die körnige Degeneration. Alte (nach Roux durch Kaliumbichromatzusatz zur Sporenbildung unfähig gemachte) Milzbrandkulturen zeigen dieselbe Zunahme ihrer Widerstandsfähigkeit; ein Gleiches beobachtet man bei den mit Mineralsäuren behandelten und dann ausgewaschenen Kulturen. Diese Thatsachen scheinen anzudeuten, daß unter gleichen Löslichkeitsbedingungen der Enzyme der Grad der Bakteriolyse von der Durchlässigkeit und dem sonstigen Verhalten des Bacillenprotoplasmas abhängt.

VI. Schlußfolgerungen.

1) Der noch am Schlachttage des Tieres (Schwein oder Rind) ausgepreßte Schilddrüsen-, Nieren- und Muskelsaft verdaut innerhalb 1 bis 3 Tagen bei der Temperatur von 35—38° C im Minimum 10 Proz. seines Gewichtes 1-tägiger Milzbrandkultur.

Der Zusatz von 2 Proz. Fluornatrium beeinträchtigt die Verdauung keineswegs, bietet dagegen den Vorteil, daß das Aufkommen fremder Bakterien dadurch verhütet wird.

2) Das Hühnerei, resp. die Mischung des Weißen mit Dotter, besitzt Bakterienverdauungsvermögen, das mit der Zeit zunimmt.

3) Das erste Zeichen der chemischen Veränderung des B. anthracis ist der Verlust des Vermögens, die basische Farbe des Gramschen Verfahrens festzuhalten, während er sich um so stärker mit Eosin sättigt, je weniger die Verdauung vorgerückt ist. Das Endprodukt der Bakteriolyse ist eine amorphe Materie von schleimiger Konsistenz und grauer Farbe.

4) Chemisch scheint die Bakteriolyse das Ergebnis einer Hydrolyse zu sein. Die betreffenden Enzyme greifen den Bacillus entweder von der Oberfläche her an und verflüssigen ihn von außen nach innen, oder sie dringen gleich in die ganze Masse, um dieselbe zum Schmelzen zu bringen, je nachdem sie mehr oder weniger löslich und diffusibel sind.

5) Die einer Erhitzung unterworfenen, mit einer Mineralsäure behandelten oder lange stehen gelassenen Milzbrandbacillen zeigen eine größere Widerstandsfähigkeit gegen die Bakteriolyse als die frischen Kulturen entnommenen.

Barcelona, März 1902.

Ueber die bei den Hornhautvaccineherden vorkommenden Zelleinschlüsse.

[Aus den „Laboratori di Sanità Pubblica“ zu Rom.]

Dritte vorläufige Mitteilung[1]).

Von Privatdocent Dr. med. C. **Gorini.**

Mit 2 lithographischen Tafeln.

Ueber die beginnenden vaccinischen Hornhautherde.

In zwei früheren Mitteilungen (II und III) habe ich die Ergebnisse verschiedener Untersuchungen dargelegt, die ich zur Würdigung der Natur der Vaccinekörperchen (Cytoryctes vaccinae Guarnieri) ausgeführt habe, nachdem ich ihre Spezifizität durch verschiedene Kontrollversuche mit nicht vaccinischen Materialien festgestellt und ihrem Auftreten in dem Hornhautepithel des Kaninchens einen diagnostischen Wert zugeschrieben hatte, um die Wirksamkeit des Jenner'schen Vaccins zu kontrollieren (I). In jenen Arbeiten hatte ich folgende Fragen nacheinander zu beantworten gesucht:

1) Da man durch nicht vaccinische Materialien keine den typischen Cytoryctes ähnliche Körperchen erhält, welches sind dann die differentiellen Merkmale der Cytoryctes?

2) Angenommen, daß die charakteristischen Merkmale der typischen Cytoryctes in ihren Form- und Situationsbeziehungen zu den Epithelkernen bestehen, welches sind die Beziehungen zwischen den Cytoryctes Guarnieri, welche extranukleär sind, und den endonukleären Körperchen, die auch bei den vaccinischen Herden vorkommen?

3) Auf Grund der Thatsache, daß sowohl bei vaccinischen als cancrösen Herden lebhafte und abnorme Epithelwucherung statthat, und der Annahme Rechnung tragend, daß beide Krankheiten durch protozoische Parasiten hervorgebracht werden, was haben die vaccinischen Zelleinschlüsse mit denen der bösartigen Geschwülste gemein?

4) In Erwägung, daß verschiedene Forscher die bösartigen Geschwülste als durch Mycetozoen verursacht betrachten, welche Vergleiche werden zwischen der vaccinischen und der mycetozoischen (durch Plasmodiophora Brassicae Woronin hervorgerufenen) Infektion der Hornhaut möglich?

---

1) Diese Mitteilung wurde mit Darstellung von mikroskopischen Präparaten in der Sitzung vom 31. März 1901 in der „Reale Accademia Medica di Roma“ vorgetragen. (Bulletino della R. Accademia medica di Roma. Anno XXVII. Fasc. 7.)

Sie kommt meinen folgenden Arbeiten über Vaccine nach:

Gorini, I. Il controllo del vaccino mediante le inoculazioni corneali. (Archivio per le Scienze mediche. Vol. XXIII. 1898. p. 127 und Atti dei Laboratori di Sanità Pubblica. Roma 1898.)

II. Ueber die bei der mit Vaccine ausgeführten Hornhautimpfung vorkommenden Zelleinschlüsse und über deren Beziehungen zu Zellinklusionen der bösartigen Geschwülste. (Centralbl. f. Bakt. etc. 1. Abt. Bd. XXVIII. 1900. No. 8/9. p. 233.)

III. Ueber die bei den Hornhautvaccineherden vorkommenden Zelleinschlüsse. (Centralbl. f. Bakt. etc. 1. Abt. Bd. XXIX. 1901. No. 14. p. 589. Mit 2 lith. Tafeln.)

IV. Ricerche sul vaccino sperimentale. (Il Policlinico. Sezione pratica. 11. Mai 1901. p. 883.)

5) Da das in Glycerin konservierte kutaneelle vaccinische Virus lange Zeit wirksam bleibt, war zu erforschen, wie sich das corneelle vaccinische Virus und die darin enthaltenen Cytoryctes in Glycerin verhalten?

Ohne die einzelnen Ergebnisse jener Untersuchungen hier zu wiederholen, werde ich mich darauf beschränken, die zusammenfassenden Schlüsse nochmals mitzuteilen:

„Obwohl die Auskunftsmittel, welche ich zur Lösung der Frage nach der Natur der Vaccinezellinklusionen (**Cytoryctes vaccinae** Guarnieri) anwandte, ihr Ziel nicht erreicht haben, dienten sie doch dazu, einige Thatsachen aufzustellen, welche dazu beitragen, entweder den **Cytoryctes** eine nukleäre Abstammung zuzuschreiben oder zu vermuten, daß es sich um Parasiten handelt, die auch den Kern der Epithelzellen angreifen und die bei einer Phase ihrer Entwickelung aus dem **Cytoryctes** und der umhüllenden hellen Zone zusammengesetzt sind (III)."

* * *

Ein neuer Standpunkt, unter dem ich das Argument studieren wollte, betrifft die vaccinischen Hornhautherde bei ihrem Beginne. Was beobachtet man bei diesen anfangenden Herden vor dem Auftreten der **Cytoryctes**?

Es ist nicht möglich, genau die Zeit zu bestimmen, die nach der Inokulation verflossen sein muß, um bei Exportation der Hornhäute über Herde zu verfügen, die bereits Veränderungen darbieten, aber noch Cytoryctes-frei sind, da die Cytoryctes manchmal schon während der ersten 24 Stunden sichtbar werden, während andererseits nicht selten die Hornhaut auch 24—36 Stunden lang nach erfolgter Inokulation noch normal erscheinen kann. Diese Verschiedenheit hängt namentlich von der Virulenz des angewandten Vaccins, aber auch von der Größe des erzeugten Schnittes ab. Durch fortgesetzte Versuche ist es mir aber gelungen, eine gewisse Zahl von Herden zu erlangen, die sich noch in der präcytoryctischen Phase befanden, und konnte ich an denselben folgende 3 Arten von Veränderungen konstatieren:

1) Mehrfache und zusammengesetzte Epithelkerne, typische und atypische Karyokinese etc.

2) Austreten von Chromatin aus den epithelialen Kernen.

3) Auftreten von coccusförmigen Körnchen in den epithelialen Zellen.

Mit den zwei ersten Reihen von Veränderungen habe ich mich schon in den früheren Arbeiten beschäftigt, indem ich sie als Zeichen einer Hyperaktivität des Kernes ansah und ihre wahrscheinlichen Beziehungen zu den Cytoryctes andeutete. Deshalb werde ich mich hier bei diesen beiden Erscheinungen nur aufhalten, um die Aufmerksamkeit auf die Thatsache zu lenken, daß sie vor dem Auftreten der Cytoryctes vorkommen (siehe Fig. 1, 2 u. 3). In dieser dritten Mitteilung werde ich hauptsächlich die coccusförmigen Körnchen abhandeln.

* * *

Seit meinen ersten Untersuchungen über die mit Vaccine von verschiedener Qualität und Herkunft ausgeführten Hornhautimpfungen bei den Kaninchen hatte ich in dem Hornhautepithel außer dem klassischen

Cytoryctes Guarnieri namentlich an der Peripherie der vaccinischen Herde eine endocelluläre Invasion von Körnchen bemerkt, welche sich, ebenso wie die Cytoryctes, durch Delafield's Hämatoxylin mehr oder weniger stark färbten. Diesen Körnchen, welche als kleine alone-(hof-)lose Cytoryctes betrachtet werden können, gab ich in meinen Anmerkungen den Namen chromatischer Staub. Bezüglich ihrer Natur war ich, wie bei den Cytoryctes, zwischen der parasitären und der nukleären Theorie im Zweifel geblieben, nur hatte ich die leukocytäre Theorie aus dem Grunde ausgeschlossen, weil die oben genannten Körnchen, ebenso wie die Cytoryctes, auch dann vorkamen, wenn man in der Hornhaut jene Reaktion hatte, die ich in meiner Arbeit über die biologische Kontrolle der Vaccine als normale (d. h. ohne Begleitung von entzündlichen Phänomenen und ohne Einwanderung von Leukocyten in die Herde) bezeichnete.

In letzter Zeit aber habe ich beim Studium der beginnenden Herde feststellen können, daß jener chromatische Staub vor dem Auftreten der Cytoryctes sich zeigt, und daß er von jenen verschiedenen Aeußerungen von Kernhyperaktivität begleitet ist, die ich in den früheren Mitteilungen beschrieb und die in den Fig. 1, 2 und 3 dargestellt sind.

Diese Beobachtung veranlaßte mich, meine Aufmerksamkeit mehr als vorher auf jene Körnchen zu richten, welche auf den ersten Blick wie aus einem einzigen Elemente gebildet erscheinen (siehe Fig. 2), bei genauerer Untersuchung dagegen sich als aus Aggregaten von 2, 3 oder (am meisten) 4 coccusgestaltigen Körperchen zusammengesetzt erweisen, die an Coccus tetragenus erinnern.

Diese Aehnlichkeit erregte in mir den Verdacht, daß sie bakterischer Natur sein könnten.

Durch Präparate, die mit Kokkenkulturen gefertigt waren, bestätigte ich, daß die Kokken sich, ebenso wie die oben genannten Körnchen, durch Delafield's Hämatoxylin färben, sowohl wenn man das Präparat auf die Flamme ut more fixiert, wie auch wenn man es durch Essigsäuresublimat fixiert und nachher so wie die Schnittpräparate von Hornhaut behandelt.

Mittels Kontrollproben, welche durch einfache Einschnitte und auch durch kleine Excisionen der Hornhaut ausgeführt wurden, überzeugte ich mich, daß eine solche von Epithel begrenzte und von den oben genannten Zellveränderungen begleitete Invasion von coccusförmigen Körperchen den gewöhnlichen fremden Keimen nicht zugeschrieben werden kann, welche auf der normalen Bindehaut der Kaninchen vorhanden sind.

Auch an pyogene Keime war nicht zu denken, denn, wie gesagt, der chromatische Staub kommt auch in den Fällen von normaler vaccinischer Reaktion vor, welche von entzündlichen, auf pyogene Inquination deutenden Phänomenen nicht begleitet sind.

Es blieb nur übrig, anzunehmen, daß die oben genannten Körnchen das Produkt der endocorneellen Vermehrung von nicht pyogenen, in dem inokulierten Materiale enthaltenen Keimen sind. Und zwar habe ich mehrere Male Gelegenheit gehabt, zu konstatieren, daß die Vaccine, selbst wenn sie hinlänglich gereinigt ist, um normale corneelle Reaktion zu erzeugen, bei den Kulturen zeigt, daß sie manchmal sehr beträchtliche Mengen von Mikroorganismen und namentlich von Kokken enthalten kann.

* * *

Zur Erörterung der Frage sollte man untersuchen, ob man durch sterile Vaccine die coccusförmigen Körnchen so wie die Cytoryctes erhält.

Im Laufe meiner Studien über Vaccine konnte ich mich überzeugen, daß es sehr schwierig ist, über Lymphe zu verfügen, welche aktiv und zugleich ganz steril ist. Ich kann sogar sagen, daß ich unter 53 untersuchten aktiven Lymphen nur 1mal einer absolut sterilen begegnete, die ich selbst bereitet hatte, um zu beweisen, daß das Auftreten der Cytoryctes unabhängig von der Anwesenheit kultivierbarer Keime in der Vaccine ist (cfr. meine Arbeit I).

Vielmehr hatte ich es mit Vaccine zu thun, welche nur einen Teil der Kulturplatten oder nur einige Stellen einer Platte fertilisierte, während sie sich im übrigen steril zeigte. Das erklärt sich um so leichter, wenn man bedenkt, daß es sich um ein nie vollständig homogenes Material handelt.

In der Absicht, mich von der absoluten kulturellen Mikrobenfreiheit des Impfmateriales zu überzeugen, habe ich mich des Auskunftsmittels bedient, dieselben Portionen von vaccinischer Saat zu benutzen, die auf den Agarplatten 3 Tage lang im Brütofen bei 35—37° C lagen, ohne sich zu fertilisieren.

Aus zahlreichen Proben ergab es sich, daß nach diesem Inkubationszeitraum neue Kolonieen auf den Platten von Vaccine nicht mehr erscheinen; nichtsdestoweniger, um den Zweifel selbst auszuschließen, daß die aufgehörte Entwickelung von Kolonieen durch die Austrocknung oder durch andere Veränderungen des Nährmateriales während seines Aufenthaltes im Brütofen verursacht würde, versuchte ich, die steril gebliebene Saat auf neue frische Agarplatten oder in Bouillon zu übertragen, aber immer mit negativem Erfolge.

Es ist überflüssig, zu sagen, daß die Untersuchung der Platten immer vermittelst des Mikroskopes (Ok. 4, Obj. 2, Tubuslänge 160, Koritska) durchgeführt wurde.

Selbst mit diesem unzweifelhaft sterilen Materiale erlangte ich bei den Hornhautimpfungen sowohl coccusförmige Körnchen wie auch Cytoryctes.

Nun wollte ich dieselbe Lymphportion mikroskopisch untersuchen, welche auf den Platten steril geblieben war und auf der Hornhaut ein positives Ergebnis gegeben hatte. Zu diesem Zwecke, da ich keine befriedigenden Resultate aus den ut more gefertigten Platten mit durch Platinnadel entnommenem Materiale erhielt, entschloß ich mich, Klatschpräparate anzuwenden, indem ich sterilisierte Deckgläschen auf die sterilen Stellen der Platten auflegte und schwach preßte; die Präparate wurden teils auf der Flamme, teils durch Essigsäuresublimat fixiert und durch Delafield's Hämatoxylin gefärbt.

In allen Präparaten beobachtete ich folgendes (siehe Fig. 4):

a) Vereinzelte oder zusammengruppierte Zellen, die noch unversehrt waren und mit teils gut konservierten und teils verschiedenartig fragmentierten Kernen versehen waren;

b) formlose Anhäufungen von desintegrierten Zellen mit Kernen ut supra;

c) sehr spärliche paranukleäre Körperchen (Fig. 4*c*) (vermutlich Cytoryctes?);

d) eine Menge von coccusförmigen Körnchen verschiedener Größe und verschiedener Farbe, welche sowohl in den unversehrten Zellen

wie in den formlosen Aggregaten lagerten. Einige von diesen Körnchen, welche sehr winzig, zusammengezogen und gelblich gefärbt waren (Fig. 4*b*), hatten das Ansehen von Bakterienleichen (?). Andere dagegen, welche größer, angeschwollener und mehr oder weniger stark violett gefärbt waren, konnten als lebensfähige Kokkenbakterien betrachtet werden. Aber die merkwürdigere Thatsache ist die, daß sogar diese letzteren zu 2, 3 oder (am meisten) 4 zusammengruppiert waren, ganz genau wie die Kokken von Tetragenes und wie die coccusförmigen Körnchen der vaccinischen Herde (Fig. 3*aaa*).

Deshalb, wenn wir die Hypothese festhalten, daß die coccusförmigen Körnchen der vaccinischen Herde bakterischer Natur sind, scheint es zulässig, anzunehmen, daß sie aus der endocorneellen Vermehrung der ähnlichen Formen herstammen, welche in der inokulierten Vaccine enthalten sind. Es würde daraus folgen, daß die Sterilität einer Lymphe auf den üblichen Kulturböden, welche doch zur Züchtung der gewöhnlichen fremden Keime der Vaccine (pyogenes und nicht pyogenes, B. pseudodiphtheriae, B. coli u. a.) geeignet sind, uns nicht berechtigen würde, sie frei von Bakterien zu halten, welche imstande sind, in der Kaninchenhornhaut, d. i. im tierischen lebenden Organismus, sich zu entwickeln.

Es würde jetzt noch übrig bleiben, zu entscheiden, ob es sich um streng parasitische Bakterien handelt, die sich außer dem Organismus nicht entwickeln, oder um nicht obligate Parasiten, welche durch die verlängerte Aufbewahrung in Glycerin sich dermaßen in ihrer Lebensfähigkeit abgeschwächt haben, daß sie sich nicht mehr auf den üblichen Kulturmitteln entwickeln können, sondern der Passage durch den lebenden Organismus bedürfen.

Um auf diese Fragen zu antworten, untersuchte ich mehrmals die Kultur des Abkratzungsmateriales von vaccinierten Hornhäuten, indem ich kleine Stückchen von corneellem Epithel auf Agarplatten schabte; diese aber blieben meistenteils steril oder sie führten zur Entwickelung einiger Kolonieen der sogenannten Xerosebacillen, der Pseudodiphtheriebacillen, welche gewöhnliche Bewohner der Bindehaut und bei corneellen Inokulationen ohne bemerkenswerten Einfluß sind (cfr. meine Arbeit I).

(Schluß folgt.)

Zur Kenntnis der Trematodenfauna des Triester Hafens.

Von A. Looss, School of Medicine Cairo.

II. Ueber *Monorchis* Montic. und *Haplosplanchnus* n. g.

Mit 4 Figuren.

In der 7. Serie seiner Brani di Elmintologia tergestina[1]) beschreibt Stossich ein *Distomum monorchis* aus den Appendices pyloricae und dem Dünndarme von *Cantharus orbicularis*. Monticelli vereinigt die Art mit *Dist. pachysomum* Eysenh. zu dem Untergenus *Monorchis*[2]),

1) Boll. Soc. Adriatica Trieste. Vol. XII. 1890. Estr. p. 2. Taf. 15. Fig. 62.

2) Studii sui trematodi endoparassiti. (Zool. Jahrb. Suppl. III. 1893. p. 149.)

ohne einen Typus für dasselbe zu nennen. Stiles und Hassall bestimmen hierzu *Dist. monorchis* Stoss. und bemerken dabei: We designate *Dist. monorchis* as the type of this subgenus, but do not care to express an opinion on the validity of the group[1]). Ich werde auf meine Ansichten über diese Art und Weise, die Nomenklatur unsererer Tiere zu „ordnen" und „stabil" zu machen, an einem anderen Orte zurückkommen; hier will ich das thun, was Stiles und Hassall hätten thun müssen, wenn die Ernennung von *Dist. monorchis* als Typus der Gattung (früheren Untergattung) *Monorchis* nicht nur auf dem Papiere, sondern in der Praxis einen Wert haben sollte; d. h. erst die Art genau untersuchen und dann die Gattung auf sie begründen. Ich habe *Dist. monorchis* während meines Aufenthaltes in Triest an demselben Orte wie Stossich mehrfach angetroffen und kann daraufhin das von dem Autor entworfene Bild des Tieres in folgender Weise vervollständigen.

Der Körper ist klein, von mäßiger Dicke und im Prinzip länglichovalem Umriß, das Hinterende oft ein wenig mehr zugespitzt als das vordere. An letzterem liegt, mit seiner Oeffnung leicht ventralwärts geneigt, der große Mundsaugnapf; der kleinere Bauchsaugnapf findet sich noch etwas vor der Körpermitte. Die Haut ist in ganzer Ausdehnung und in der vorderen Körperhälfte am dichtesten, mit langen, spitzen Stacheln durchsetzt. Auf den Mundsaugnapf folgt, von ihm durch einen ganz kurzen Präpharynx getrennt, ein relativ kleiner, kugeliger Pharynx, und auf diesen ein dünner Oesophagus von ungefähr derselben Länge wie der Pharynx. Die Darmschenkel verlaufen von der Gabelungsstelle aus nach außen und dann in der Hauptsache parallel den Körperrändern nach hinten. Daselbst findet sich in Quetschpräparaten auch der Exkretionsporus, bei konservierten Tieren dagegen gehört er deutlich der Rückenfläche an; die Exkretionsblase ist infolge der Kürze ihres unpaaren Teiles mehr V- als Y-förmig; die Schenkel scheinen bis in die Höhe der inneren weiblichen Genitalien emporzureichen, doch habe ich ihre Enden mit Bestimmtheit nicht ermitteln können. Der ziemlich weite Genitalporus liegt median dicht hinter der Darmgabelung, dem Bauchsaugnapfe näher als dem Mundsaugnapfe; die mächtig entwickelten Kopulationsorgane treffen in einem kurzen, wenig auffallenden Genitalsinus zusammen. Cirrhusbeutel kräftig und dick, in seinem Grunde eine einfach sackförmige, kurze und dicke Samenblase; dieselbe setzt sich fort in eine spindelförmige Pars prostatica, welche ohne Dazwischentreten eines deutlich individualisierten Ductus ejaculatorius in den Penis übergeht. Letzterer ist im eingezogenen Zustande dick, spindelförmig, seine Innenwand dicht besetzt mit nach vorn gerichteten, gekrümmten Stacheln, die auf der der Körperachse zugekehrten Seite des Penis bedeutend länger und dünner, im übrigen von derb konischer Gestalt sind. Der Innenraum des Cirrhusbeutels ist ausgefüllt von sehr zahlreichen, peripher gelegenen Prostatazellen, deren lange, gerade Ausführungsgänge strahlenförmig nach der Pars prostatica zusammenlaufen. Der einfache Hoden besitzt eine mehr oder minder längliche Gestalt mit unregelmäßiger Kontur und liegt rechtsseitig in der hinteren Körperhälfte. Dicht vor ihm und mehr dorsal liegt der gelappte Keimstock, dessen langer Ausführungsgang nach hinten und der Körperachse zu sich begiebt, wo der Schalendrüsenkomplex gelegen ist. Ein Laurer'scher

1) Notes on parasites 48. An inventary etc. (Arch. de parasitol. Vol. I. 1898. p. 91.)

Kanal ist vorhanden, von einem Receptaculum seminis habe ich nichts entdecken können. Die kleinen, bäumchenförmigen Dotterstöcke liegen in der Hauptsache vor den Darmschenkeln und zu den Seiten des Oesophagus; ihre langen Ausführungsgänge konvergieren nach hinten, um sich in dem kleinen dreieckigen Dotterreservoir zu vereinigen; der von Stossich erwähnte quere Verbindungsgang der Dotterstöcke existiert nicht. Der Uterus bildet rechts und links je ein deutlich individualisiertes Konvolut von Schlingen, welches sich bei reifen Tieren auf der dem Hoden entgegengesetzten Seite weiter nach hinten ausdehnt, als auf der anderen; er geht vom Schalendrüsenkomplex aus zunächst auf die linke Körperseite, von dort hinter dem Ende des Cirrhusbeutels vorbei auf die rechte, um schließlich unter dem Cirrhusbeutel hinweg in die Vagina einzutreten. Diese repräsentiert einen voluminösen Sack von ungefähr der halben Länge des Cirrhusbeutels; ihre terminale Partie ist, der Länge des Penis entsprechend, wie dieser innerlich dicht mit langen, nach vorn gerichteten, gekrümmten Stacheln bewaffnet, die aber bedeutend dünner sind als die des Penis. Der Grund des Vaginasackes ist von ihnen frei. An der Grenze des bestachelten und nichtbestachelten Teiles der Vagina tritt seitlich, und zwar von der Mittellinie des Körpers her, der Uterus in die Vagina ein. Die Eier sind klein, regelmäßig oval, mit dünner, gedeckelter Schale von hellbrauner Farbe.

Es wird auffallen, daß in der hier gegebenen Beschreibung alle speziellen Größen- und Maßangaben weggeblieben sind; die Beschreibung ist somit nur eine Darstellung der anatomischen Organisation des *Dist. monorchis* und repräsentiert damit die Beschreibung resp. die Diagnose der Gattung, welcher *Dist. monorchis* angehört. In den meiner ausführlichen Arbeit über die Trematoden der Seeschildkröten angefügten allgemeinen Betrachtungen über die Systematik der Distomen u. s. w. habe ich den Satz aufgestellt und zu begründen versucht, daß zwischen den Angehörigen einer wirklich natürlichen Distomengattung anatomische Unterschiede überhaupt nicht existieren, und daß die unterscheidenden Merkmale der Species innerhalb der Gattung vielmehr nur durch Differenzen in der Größe und Ausdehnung der einzelnen Organe dargestellt werden. Von diesem Gesichtspunkte aus läßt sich für jede neue Gattung, auch wenn sie einstweilen nur auf eine einzige Art basiert werden muß, auch eine Gattungsdiagnose ohne weiteres geben, wenn man aus der anatomischen Beschreibung der typischen Art alle speziellen Angaben über die Größe und Ausdehnung der Organe fortläßt. Denn wenn unter den Angehörigen der natürlichen Gattungen anatomische Differenzen nicht existieren, so muß eine rein anatomische Beschreibung irgend einer Art auch eo ipso auf alle ihre wirklichen Gattungsgenossen passen. Als ein Beispiel mag hier die Gattung *Monorchis* (Mont.) Lss. dienen, deren typischen Vertreter *M. monorchis* (Stoss.) ich oben anatomisch beschrieben habe. Die Charakterisierung der Art *monorchis* wird sich nunmehr ausschließlich auf Angaben über die Größe resp. die relative Ausdehnung einzelner Organe beschränken können.

Monorchis monorchis (Stoss.), Körper im konservierten Zustande 1—1,2 mm lang und ca. 0,8 mm breit, von leicht ovaler oder fast kreisrunder Gestalt, der Mundsaugnapf oft in Gestalt einer kleinen Erhebung vorgezogen. Gequetschte Präparate (Fig. 1) messen bis zu 1,4 mm Länge bei 0,85 mm Breite. Mundsaugnapf 0,23, der kleinere Bauchsaugnapf 0,13 mm im Querdurchmesser; Pharynx ca. 0,08 mm. Keimstock ziemlich tief gelappt; Dotterstöcke aus relativ zahlreichen Follikeln

zusammengesetzt; die Uterusschlingen reichen nach vorn höchstens bis zur Höhe der Genitalöffnung. Eier im Mittel 0,021 mm lang und 0,012 mm dick. Lebt in den Appendices pyloricae und dem Anfangsdarme von *Cantharus orbicularis* und *Oblata melanura*, Triest.

Als synonym zu *M. monorchis* (Stoss.) muß ich das *Distomum tartinii* Stossich[1]) aus dem letztgenannten Wirte einziehen, da einige Typenexemplare der Art, die mir der Autor freundlichst zur Verfügung stellte, sich samt und sonders als *Dist. monorchis* erwiesen.

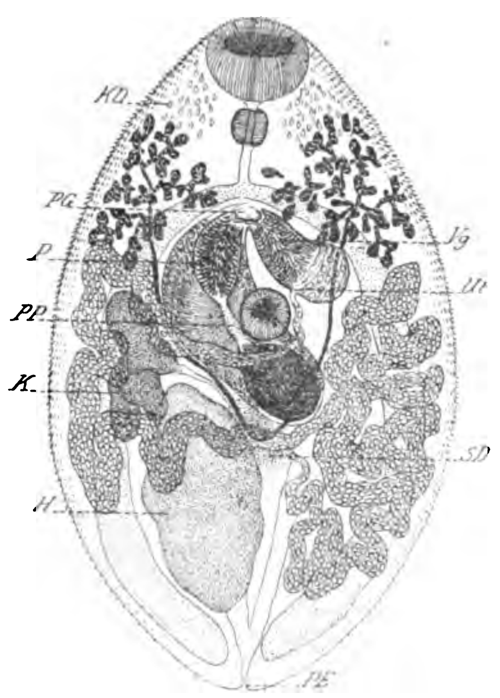


Fig. 1.

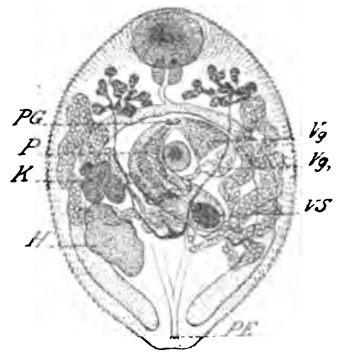


Fig. 2.

Fig. 1. *Monorchis monorchis* (Stoss.) nach einem Quetschpräparate. Vergr. ca. 64. *KD* Kopfdrüsen, *PG* Genitalporus, *P* Penis, *PP* Pars prostatica, *K* Keimstock, *H* Hoden, *Vg* bestachelter Teil der Vagina, *Ut* Eintritt des Uterus in die Vagina, *SD* Schalendrüse, *PE* Porus excretorius.

Fig. 2. *Monorchis parvus* n. sp. nach einem Quetschpräparate. Vergr. ca. 64. Vg_1 unbestachelter Teil der Vagina; die übrigen Buchstabenbezeichnungen wie in Fig. 1.

Monorchis parvus n. sp. ist eine zweite Art des Genus. Körper im konservierten Zustande fast kreisförmig oder ganz kurz oval, 0,4 mm lang und breit; gequetschte Individuen (cf. Fig. 2) messen bis zu 0,7 mm in der Länge bei 0,5 mm Breite. Mundsaugnapf 0,11—0,12, Bauchsaugnapf 0,059—0,06, Pharynx 0,07 mm der Quere nach messend. Keimstock weniger tief gelappt, Dotterstöcke aus nur wenigen Follikeln aufgebaut, die Uterusschlingen überragen in den Seiten die Höhe des Genitalporus. Eier im Mittel 0,023 mm lang, 0,013 mm dick. Lebt, soweit ich gefunden, in den Appendices pyloricae und dem Anfangsdarme von *Sargus annularis* und *Sargus rondeletii*, Triest.

Es versteht sich von selbst, daß *Dist. pachysomum* Eysenh. in der hier charakterisierten Gattung *Monorchis* (Mont.) Lss. nicht verbleiben kann, sondern zum Vertreter einer eigenen erhoben werden muß. Ich habe zu diesem Zwecke den Wurm, der häufig in den verschiedenen

1) Appunti di elmintologia. (Boll. Soc. Adriatica Trieste. Vol. XIX. 1899. Estr. p. 6. Fig. 13. Tav. I.)

Mugil-Arten des Triester Hafens vorkommt, genauer untersucht. Das Bild der anatomischen Organisation der von ihm repräsentierten Gattung ist das folgende.

Gattung *Haplosplanchnus* n. g. Körper klein, sehr kontraktil, aber verhältnismäßig wenig muskelkräftig, vorn dicker, nach hinten stark verjüngt und fast zugespitzt endigend. Saugnäpfe einander stark genähert, der Mundsaugnapf von der gewöhnlichen Form, der Bauchsaugnapf tief sackförmig, cylindrisch und in einer Verdickung des Körpers gelegen, die in Form eines plumpen Stieles über denselben erhoben und durch verstreute, vom freien Rande des Bauchsaugnapfes in das Parenchym ausstrahlende Muskeln in den Körper zurückgezogen werden kann. Die Wand des Bauchsaugnapfes erhält an seiner Oeffnung einen peripher gelegenen kräftigen Sphinkter (*sph* Fig. 3) und zwischen den Muskelfasern zahlreiche zellige Einlagerungen, die nur in der Nähe der äußeren Oeffnung fehlen. In gefärbten Präparaten tritt der Saugnapf infolgedessen als ziemlich dunkler, fast körniger Sack hervor. Der Mundsaugnapf zeigt den gewöhnlichen Aufbau und besitzt in der Mitte seines ventralen Randes eine kleine, von cirkulär verlaufenden Muskelfibrillen umgebene, kanalartige Einsenkung (*e* Fig. 3), die nach außen vorgetrieben werden kann und dann als ein feines, papillenartiges Spitzchen erscheint. Ueber die Bedeutung desselben vermag ich nichts zu sagen. Die Haut ist dünn und glatt. Auf den Mundsaugnapf folgt ein ganz kurzer Präpharynx, auf diesen ein wohlentwickelter, kugel- oder leicht birnförmiger Pharynx, der seinerseits in einen ebenfalls kurzen, von einer Cuticula ausgekleideten Oesophagus übergeht. Der Darm wird durch einen



Fig. 3. *Haplosplanchnus pachysomus* (Eysenh.); medianer Sagittalschnitt, die Organe nach den übrigen Schnitten zu einem Ganzen ergänzt. Vergr. ca. 96. · *Dst* Dotterstöcke, *J* Darm, *Oe* Oesophagus, *PP* Pars prostatica, *Pr* Prostatadrüsen, *RS* Receptaculum seminis, *Ut* Endteil des Uterus, *VD* Vas deferens, *e* kleine Einsenkung in der Mitte des ventralen Mundsaugnapfrandes, *sph* Sphincter am Eingange in den Bauchsaugnapf, *th* Teilungsstelle der Exkretionsblase.

einfachen, mit einem relativ hohen Epithel ausgekleideten Schlauch repräsentiert, der sich selbständig verlängern und verkürzen kann. Er ist nur auf die vordere Körperhälfte beschränkt.

Der Exkretionsporus liegt am Körperende und führt durch einen kurzen, engen Kanal in eine Blase von Y-förmiger Gestalt, deren oft blasig erweiterter Stamm bis an den Hoden heranreicht. Die beiden

Schenkel ziehen dorsal über den Hoden hinweg und gehen auf der ungefähren Höhe der inneren weiblichen Genitalien jeder in ein Gefäß über, welche, stark geschlängelt, bis in den Vorderkörper verlaufen und hier umzukehren scheinen.

Der Genitalporus liegt median kurz hinter dem Mundsaugnapfe; Begattungsorgane fehlen. Der relativ lange, kanalartige Genitalsinus zerfällt an seinem Ende in die beiderlei Leitungswege; der männliche beginnt mit einer schlauchförmigen Pars prostatica, die auffallend großen und ziemlich zahlreichen Prostatazellen liegen in ihrer Umgebung im Parenchym verstreut. Das in mehrfachen Windungen nach hinten ziehende Vas deferens ist in ganzer Ausdehnung mit Samenelementen gefüllt und entspricht demnach gleichzeitig einer Samenblase. Es ist nur ein einfacher, längsovaler, nahe dem Hinterende gelegener Hoden vorhanden. Dicht vor ihm liegt median oder durch Kontraktion leicht seitlich verschoben ein kugeliger Keimstock, dorsal oder mehr oder minder vorwärts von diesem, mit seinem blinden Ende nach vorn gerichtet, ein großes, sackförmiges Receptaculum seminis; ein Laurerscher Kanal fehlt. Eine Zweiteilung der Dotterstöcke ist nicht deutlich ausgesprochen; sie sind wenig entwickelt und breiten sich unter der Rückenfläche, teils mehr nach rechts, teils mehr nach links zu aus. Die Uteruswindungen sind mäßig zahlreich und dünn, so daß die Eier in ihnen meist in einfacher Reihe hintereinander liegen; der Endabschnitt des Uterus vor seinem Eintritt in den Genitalsinus ist nicht besonders differenziert. Die Eier sind von mittlerer Größe, dünnschalig und enthalten bei ihrer Ablage ein reifes Miracidium.

Den hier beschriebenen anatomischen Bau müssen meiner Ueberzeugung nach sämtliche noch aufzufindende echte Angehörige des Genus *Haplosplanchnus* zeigen. Die Speciescharaktere von

Haplosplanchnus pachysomus (Eysenh.) sind die folgenden: Länge mäßig gepreßter Individuen bis zu 3,3 mm. Mund- und Bauchsaugnapf im Querschnitte ungefähr gleich groß, 0,35 mm, die Tiefe des letzteren je nach der Kontraktion wechselnd, bis zu 0,8 mm. Pharynx im Querdurchmesser ungefähr 0,2 mm; der Darm reicht im ausgedehnten Zustande bis an das Hinterende des Bauchsaugnapfes. Die Dotterstöcke gehen nach vorn nicht viel über das Ende des Receptaculum seminis hinaus, die Uterusschlingen erstrecken sich nach hinten bis zum Vorderrande des Hodens. Die Tiere enthalten bei einer Länge von 1,2 mm bereits reife Eier von 0,04 mm Länge und 0,026 mm Dicke; mit der Größenzunahme des Körpers nimmt auch die Eigröße etwas zu, so daß man bei 3 mm Körperlänge Eier von 0,055 mm Länge und 0,031 mm Dicke findet. Die in ihnen enthaltenen Miracidien besitzen einen großen, schwarzen Augenfleck.

Wie aus dieser Beschreibung der Gattung *Haplosplanchnus* hervorgeht, besitzt dieselbe in ihrem einfach schlauchförmigen Darme einen Charakter, der sie in bemerkenswerter Weise von der Masse der übrigen Distomen trennt. Da ein derart gestalteter Darm andererseits eine gemeinsame Eigentümlichkeit der zur Zeit bekannten Aspidobothriden ist, so wird ein Vergleich von *Haplosplanchnus* mit diesen ziemlich nahe gelegt. Was nun speziell *Haplospl. pachysomus* anlangt, so kam mir beim Studium einer sagittalen Schnittserie durch dessen Körper unwillkürlich der Gedanke, daß er zu einem sehr *Aspidogaster*-ähnlichen Tiere werden würde, wenn man den schlauchförmigen Bauchsaugnapf in den Seiten der Länge nach öffnete und die hintere Hälfte seiner Wand nach hinten

umklappte. Es entstünde dann in der That eine Form, deren Organisation mit derjenigen der Aspidobothriden im Prinzip sehr gut übereinstimmen würde. Die Unterschiede im Bau des Darmapparates würden sich darauf beschränken, daß bei den Aspidobothriden die Mundhöhle nicht mehr von einem Saugnapfe umgeben ist, von dem sich nur hier und da noch (z. B. bei *Lophotaspis vallei*) Andeutungen vorfinden. Die Unterschiede im Bau des Exkretionsapparates würden ausschließlich darin bestehen, daß die bei den Aspidobothriden kleine Endblase bei *Haplosplanchnus* etwas größer wird und ein Stück auf die eintretenden Gefäße übergreift. Im Genitalapparate haben wir bei *Haplosplanchnus* nur einen Hoden, wie bei der Mehrzahl der Aspidobothriden, und ein Vas deferens, welches, wie bei diesen, als Samenblase fungiert; zwischen den weiblichen Organen finden sich Unterschiede prinzipieller Natur ebenfalls kaum, da Laurer'scher Kanal und blindgeschlossenes Receptaculum seminis einander ersetzen können und auch die paarig entwickelten Dotterstöcke (die bei *Lophotaspis* z. B. im Hinterende zusammenhängen und so ein einheitliches Ganze repräsentieren) aus einer einfachen Anlage hervorgehen. Endlich sind auch die Genitalendteile von *Haplosplanchnus* nicht wesentlich verschieden von denjenigen, die wir bei manchen Aspidobothriden finden.

Ich bin in der That der Ueberzeugung, daß wir in der Gattung *Haplosplanchnus* ein Bindeglied zwischen den genuinen Distomen und den Aspidobothriden vor uns haben. Die Entwickelungsgeschichte der letzteren ist am genauesten von *Aspidogaster conchicola* untersucht; aus der Form, in welcher dieser das Ei verläßt, kann man sich in der That ganz gut auch ein Tier von der Gestalt von *Haplosplanchnus* hervorgehend denken. Der junge *Aspidogaster* hat an Stelle der Bauchscheibe ein einfaches, saugnapfartiges Gebilde, welches von einem kurzen Zapfen, der Leibesspitze, überragt wird; durch ein Wachstum des Hinterleibes und eine damit Schritt haltende flächenhafte Vergrößerung der Bauchscheibenanlage entsteht aus dem jungen Tiere der erwachsene *Aspidogaster*; würde bei ersterem aber die Bauchscheibenanlage nicht flächenhaft, sondern nach der Tiefe und der Körper dann nach hinten über sie hinauswachsen, dann müßte eine Körperform entstehen, die, wie aus der neben-

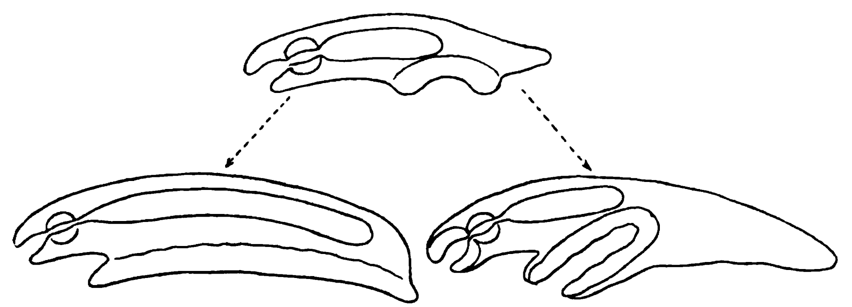


Fig. 4. Schematische Darstellung der Beziehungen des erwachsenen *Aspidogaster* und der Gattung *Haplosplanchnus* zu dem jungen *Aspidogaster*.

stehenden Skizze (Fig. 4) ersichtlich, von derjenigen von *Haposplanchnus* nicht wesentlich verschieden wäre. Ich will mit dieser Spekulation die Kritik nicht herausfordern; etwas Unwahrscheinliches oder Gezwungenes kann ich in ihr bis auf weiteres indessen nicht finden.

Bildet aber *Haplosplanchnus* thatsächlich ein Bindeglied zwischen den Aspidobothriden und den genuinen Distomen, so repräsentiert es gleichzeitig eine nicht unwesentliche Stütze der jüngst von Odhner[1]) verfochtenen Ansicht, daß die *Aspidocotylea* Montic. als gesonderte Ordnung im System nicht aufrecht zu erhalten seien. Was Odhner zu Gunsten dieser seiner Anschauung vorbringt, erscheint mir durchaus plausibel, und wenn auch zur definitiven Lösung der Frage weitere Erfahrungen noch unbedingt nötig sind, so bin ich doch bereits jetzt so gut wie sicher, daß diese Erfahrungen die Richtigkeit der Ansicht Odhner's nur bestätigen werden.

Cairo, 20. April 1902.

Die Anoplocephaliden der Vögel.

Von Dr. **O. Fuhrmann**, Académie Neuchâtel.

Mit 25 Figuren im Text.

Zweck dieser Zeilen ist, die bis jetzt in Vögeln gefundenen Anoplocephaliden anatomisch zu beschreiben, ohne aber dabei auf histologische Details einzugehen. In einer früheren Arbeit (diese Zeitschrift. Bd. XXIX. 1901. p. 757—761) habe ich kurz auf die Thatsache der Existenz von Anoplocephaliden als Parasiten in Vögeln aufmerksam gemacht, dabei nur die systematisch wichtigsten Charaktere erwähnend, welche mir die Zugehörigkeit zu den verschiedenen Genera dieser Gruppe zu beweisen schienen.

1. *Moniezia carrinoi* (Diamare).

Syn. *T. trichoglossi* v. Linstow 1888.
Paronia carrinoi Diamare 1900.

In seiner letzten Arbeit[2]) bespricht Diamare des ausführlichen und, wie mir scheint, ganz unnützerweise die Synonymie von *Paronia carrinoi* Diam. und *T. trichoglossi* von Linstow. Ich habe in meiner Arbeit ausdrücklich gesagt, daß nach der Originalbeschreibung von *T. trichoglossi* von Linstow ein Erkennen dieser Tänie unmöglich, was nach den Nomenklaturregeln, auch wenn es nicht ausdrücklich betont wird, soviel heißt, wie *Paronia carrinoi* ist der giltige Name für diese Art[3]). Warum also auf zwei Druckseiten sich über diese Sache ereifern[4])?

Diamare scheint es mir zum Vorwurf zu machen, daß ich altes Museumsmaterial ausgrabe; hierzu bemerke ich, daß dies, wie ich glaube, eine Arbeit ist, die schon lange hätte gethan werden sollen, da die

---

1) Trematoden aus Reptilien, nebst allgemeinen systematischen Bemerkungen. (Öfversigt K. Vetensk. Akad. Förh. Stockholm 1902. p. 43 f.)

2) Diamare, V., Zur Kenntnis der Vogelcestoden. — Ueber Paronia Carrinoi (mihi). (Centralbl. f. Bakt. etc. Abt. I. Bd. XXX. 1901. p. 369—373.)

3) In einem anderen später geschriebenen Aufsatz — Neue Arten und Genera von Vogeltänien (Zool. Anz. Bd. XXIV. p. 273) — sage ich ausdrücklich *T. trichoglossi* ist identisch mit *P. carrinoi*, wie Diamare es ausgedrückt haben wollte.

4) Wenn es festgestellt ist, daß *Taenia trichoglossi* v. Lstw. identisch mit *Paronia carrinoi* Diam. ist, so muß die Species trotz der ungenügenden ersten Beschreibung den ihr hierbei gegebenen Namen behalten. M. Br.

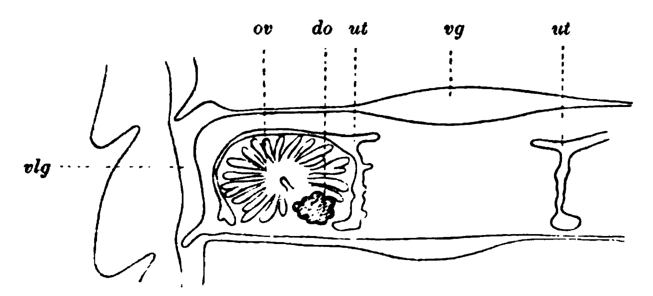


Fig. 1.

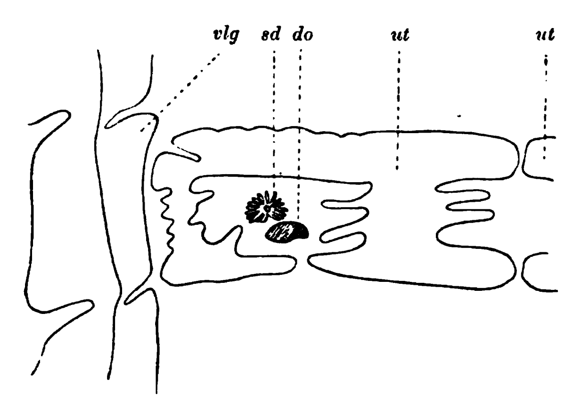


Fig. 2.

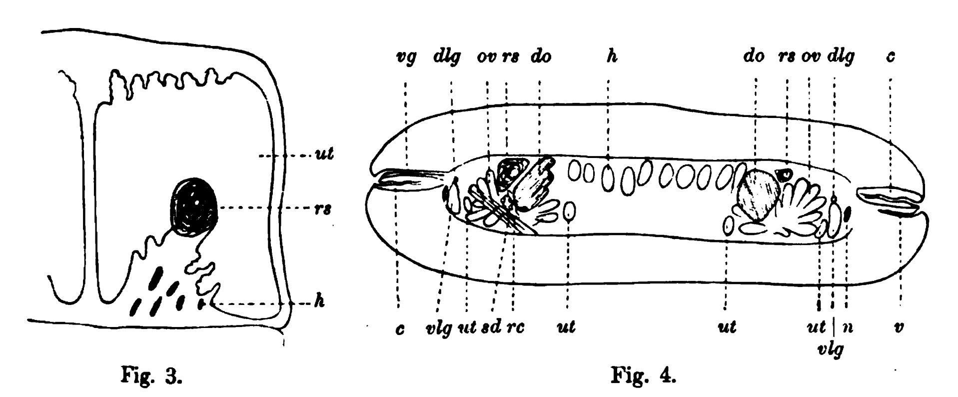


Fig. 3.

Fig. 4.

Fig. 1. Horizontalschnitt durch eine junge Proglottis (linke Hälfte); *do* Dotterstock, *ov* Ovarium, *ut* Uterus, *vlg* ventrales Längsgefäß, *vg* Verbindungsgefäß.

Fig. 2. Horizontalschnitt durch eine ältere Proglottis (linke Hälfte); Bezeichnungen wie in Fig. 1. *sd* Schalendrüse.

Fig. 3. Horizontalschnitt durch eine reife Proglottis (rechte Hälfte; *ut* Uterus, *rs* Receptaculum seminis, *h* Hodenreste.

Fig. 4. Einzelner Querschnitt, besonders die Ausmündung der Geschlechtsgänge zeigend. *vg* Vagina, *c* Cirrusbeutel, *h* Hoden, *rc* Retractor des Cirrusbeutels, *ov* Ovarium, *do* Dotterstock, *sd* Schalendrüse, *rs* Receptaculum seminis, *ut* Uterus, *vlg* ventrales Längsgefäß, *dlg* dorsales Längsgefäß, *n* Längsnerf.

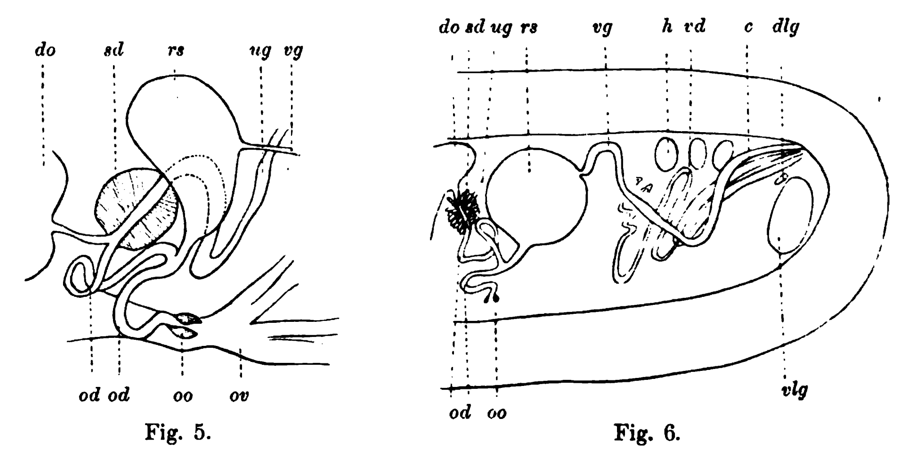


Fig. 5. Rekonstruktion des Verlaufes der Geschlechtsgänge nach zwei Schnitten. Bezeichnungen wie in Fig. 4. *oo* Oocapt, *od* Oviduct, *ug* Uteringang.

Fig. 6. Teil eines Querschnittes (Originalmaterial Diamare). Bezeichnungen wie in Fig. 4 u. 5.

Untersuchung der Originale der älteren Autoren manche Konfusion und Verwirrung in der Synonymie vermieden und auch die Artzahl einerseits nicht unwesentlich reduziert, andererseits aber auch sehr vermehrt worden wäre. Dies beweisen die in ganz gleichem Sinne an Trematoden ausgeführten wertvollen Untersuchungen von Prof. Braun und Lühe.

Das Wenige, was ich bis jetzt von meinen Untersuchungen publiziert habe, zeigt ebenfalls, wie viele anatomisch überaus interessante und eigentümliche Arten seit Jahrzehnten in unseren Museen begraben liegen.

Andererseits haben diese Untersuchungen auch gezeigt, wie merkwürdig! unrichtig ein sehr großer Prozentsatz (bis 60 Proz.) der in den europäischen Museen angehäuften, zum Teil sehr wertvollen Materialien bestimmt ist; dieses lehrt uns, wie wenig Vertrauen man oft auf viele ältere und zum Teil auch neuere Angaben in der Litteratur setzen kann (siehe weiter unten).

M. carrinoi bewohnt den Darm verschiedener Papageien und soll nach Diamare auch in der Taube *Ptilonopus* spec. vorkommen. Meine gegenteilige Behauptung, welche ich in dieser Arbeit beweisen werde, erklärt der Verfasser als eine willkürliche, ohne sich die Mühe zu geben, seine Präparate etwas näher anzusehen. Zugleich fügt er bei, daß meine Ansicht, daß jede größere Vogelgruppe ihre besonderen Tänienarten habe, durch zahlreiche gegenteilige Angaben widerlegt sei. Allerdings bestehen derartige Angaben in der Litteratur, aber nicht in der Wirklichkeit, so weit wenigstens bis jetzt unsere Kenntnisse reichen. Aus der Litteratur sind außer dem obengenannten uns nachfolgende erwähnenswerte Fälle bekannt:

1) *Taenia lanceolata* Bloch soll außer in *Lamellirostres* auch in *Podiceps* und *Phoenicopteros* vorkommen.

Wie ich am Originalmaterial nachweisen konnte, ist die *T. lanceolota* aus *Podiceps* nichts anderes als der interessante getrenntgeschlechtliche Cestode *Dioicocestus aspera* (Mehlis), die *T. lanceolata* aus *Phoenicopterus* identisch mit *Amabilia lamelligera* (Owen).

2) *T. filum* Goeze bewohnt Watvögel und soll auch in einer Varietät in dem Raubvogel *Polyborus tharus* vorkommen.

Die Untersuchung des vom Hamburger Museum mir gütigst überlassenen Originalmateriales zeigte, daß es sich um ganz junge Exemplare wohl mit einer Beute verschluckter *T. filum* handelt; ähnliche Fälle sind auch schon für andere zufällig in Raubvögeln gefundene Tänien (*T. undulata* etc.) nachgewiesen worden.

3) *Tetrabothrius porrigens* Molin, aus *Grallatores* bekannt, soll nach Stossich auch *Larus* bewohnen; seine Beschreibung aber scheint zu beweisen, daß es sich um junge Exemplare von *T. cylindraceus* oder *T. erostris* handelt.

4) *Tetrabothrius macrocephalus* (Rud.) kommt in *Podiceps*, aber nach Cobbold auch in *Totanus* vor. Die Bestimmungen der Tänien in der diesbezüglichen Arbeit scheinen mir im allgemeinen wenig sicher.

5) *Fimbriaria fasciolaris* (Pallas) ist haupsächlich in Entenvögeln gefunden worden, soll aber auch, nach Creplin und Molin, im Huhne vorkommen. Die diesbezüglichen Angaben scheinen auch Wolffhügel[1]) etwas sonderbar, auf jeden Fall liegt kein Beweis für die Richtigkeit derselben vor.

6) *T. filiformis* Rud. wird aus *Psittacus* und kuckuckartigen Vögeln (*Gallirex*) angegeben, die Beschreibung ist aber eine rein äußerliche und so mangelhafte, daß man weder in einem noch anderen Falle weiß, um was für eine Tänie es sich eigentlich handelt. Das Originalmaterial scheint verloren gegangen zu sein.

7) Was nun den von mir publizierten Fall anbetrifft, nach welchem *Amerina longiovata* in *Passeres* und in *Plegadis* vorkommen soll, so kann ich hier nicht auf eine nähere Diskussion desselben eingehen und will nur bemerken, daß, da ich keine Korrekturbogen des betreffenden Aufsatzes erhalten hatte, das hinter *Plegadis* stehende Fragezeichen vergessen geblieben ist.

Dies sind alle mir bekannten in Betracht kommenden Fälle, denn Angaben, wie die jüngst von Leonardi (1898) publizierte, welche das Vorkommen von *T. mediocanellata!* in *Himantopus!* behauptet, sind wohl nicht zu berücksichtigen.

Es geht aus obigem hervor, daß bis jetzt kein einziger sicherer Fall bekannt ist, der meine aufgestellte Behauptung widerlegte, womit ich keineswegs sagen will, daß dies nicht möglich sei.

Die Spezialisierung des Wohnortes geht übrigens für sehr viele Vogeltänien noch viel weiter, indem sie, soweit unsere Kenntnisse reichen, nur ganz bestimmte kleinere Wirtsgruppen bewohnen können, was übrigens auch für viele andere Helminthen anderer Wirbeltiere gilt.

Da ich eine neue Art von *Moniezia* (*Paronia*) aus der Taube zu charakterisieren haben werde, so sehe ich mich genötigt, zuerst eine etwas genauere Beschreibung von *M. carrinoi* zu geben. Damit kann ich zugleich den Vorwurf von Diamare, daß ich seine erste Darstellung der obigen Tänie nicht genügend korrigiert und ihm diese Aufgabe überlassen habe, wieder gut machen, da leider noch gar manches zu berichtigen und zu ergänzen übrig bleibt. Ich erhalte dadurch zugleich die Gelegenheit, meine von Diamare als „willkürliche Behauptungen" und „Geburt der Phantasie" bezeichneten Angaben nochmals näher zu besprechen.

Das mir zur Verfügung stehende Material ist, soweit es von Prof. Parona stammt, dasselbe, welches Diamare vorgelegen hat; es ist

---

1) Wolffhügel, K., Beitrag zur Kenntnis der Vogelhelminthen. Freiburg 1900. p. 72.

größtenteils wenig gut erhalten und leicht maceriert, was schon aus dem äußerlichen Vergleich desselben mit dem Originalmaterial von Linstow's (*T. trichoglossi*, British Museum) und dem aus dem Hamburger Museum stammenden Exemplaren ersichtlich ist. Letztere Materialien sind ausgezeichnet konserviert und zeigen, daß dieser Cestode verhältnismäßig dick, so daß es unmöglich ist, mit demselben Totalpräparate herzustellen, auf welchen irgend welches anatomische Detail sichtbar wäre, während solches mit dem Material, das ich der Güte von Prof. Parona verdanke, sogar ohne Färbung leicht gelingt. Ich habe deshalb von diesem letzteren nur Totalpräparate gemacht und bezieht sich die anatomische Beschreibung ganz auf das Material des Britischen und Hamburger Museums.

Die Parenchymmuskulatur, ein für Tänien systematisch oft sehr wichtiger Charakter, zeigt dieselbe Disposition wie bei Moniezien und vielen anderen Anoplocephaliden. Die inneren Transversalmuskeln sind sehr gut entwickelt und es erfüllt auf Querschnitten die Längsmuskulatur das ganze Rindenparenchym. Die inneren Längsfasern sind in geschlechtsreifen Gliedern zu kleinen, meist etwa 8—10 Fasern umfassenden Bündeln vereinigt. Nach außen waren diese Bündel kleiner und zeigen sich bald nur noch einzelne Fasern. Die äußersten Muskeln sind wohl größtenteils nach der Cuticula ausstrahlende Fasern, wie solche bei sehr vielen Tänien konstatiert werden. Die Dorsoventralfasern sind sehr zahlreich.

Das Nervensystem zeigt in den Proglottiden nichts Besonderes.

Die Disposition der männlichen Geschlechtsorgane wird von Diamare folgendermaßen charakterisiert (diese Zeitschr. Abt. I. Bd. XXVIII. p. 846): „Die Penistasche, ziemlich lang, darmförmig und gewunden, öffnet sich, indem sie sich von oben nach unten, von dem dorsalen nach dem ventralen Rande richtet. Die sehr zahlreichen Testikel nehmen den ganzen Rand der Proglottis ein, der sich vor dem Ovarium befindet und den ich den ventralen zu nennen pflege, während ich dorsal denjenigen nenne, der dem Rücken des Ovariums entspricht.“ In Wirklichkeit liegen die Verhältnisse folgendermaßen: Die männlichen Geschlechtsdrüsen bilden eine vollständige, meist einfache Lage von großen, dorsal gelegenen Hodenbläschen, welche bis an den Rand des Markparenchyms gehen und in geschlechtsreifen Gliedern nur in der Region des Receptaculum seminis, selten oder nur wenig in der des Dotterstockes fehlen, da diese beiden Organe bis an die dorsale Muskulatur hinanreichen. Sie nehmen gut entwickelt etwa die halbe, und nicht wie man nach Diamar's Zeichnung glauben könnte, etwa $^1/_{10}$ der Höhe des Markparenchyms ein. (Höhendurchmesser der Hoden 0,09 mm, Breite 0,045 mm). Auf Flächenschnitten scheinen sie, weil dicht gedrängt, oft von unregelmäßigem Umriß. Die Zahl der Hodenbläschen beträgt ca. 140; sie sind nicht in zwei Gruppen, für jeden der beiden seitenständigen Cirrusbeutel, geteilt. Das Vas deferens zeigt wenige Schlingen und mündet jederseits in einen schlauchförmigen muskulösen Cirrusbeutel, der meist gekrümmt ist und nie, weder auf einzelnen Flächennoch Querschnitten, ganz zu sehen ist. Der Retraktor heftet sich am inneren Ende des Muskelbeutels an, zieht zwischen den Eischläuchen des Ovariums durch ventralwärts, um sich unter dem Dotterstock mit der Transversalmuskulatur zu vereinigen. Der Cirrusbeutel ist 0,3 bis 0,45 mm lang und so eng, daß zwischen dem fast gerade verlaufenden Cirrus kaum Raum für das Parenchym bleibt. Der Cirrus selbst ist,

wie Diamare richtig bemerkt, kurz und sehr dickwandig. Am inneren Ende des Cirrusbeutels liegt eine kleine ovale Vesicula seminalis (0,09 mm lang). Der Cirrusbeutel geht über dem Wassergefäßsystem und Nervenstrang durch; seine Lagebeziehungen zur Vagina werden weiter unten besprochen werden.

Wie die männlichen Geschlechtsorgane, so sind auch die weiblichen doppelt. Die weiblichen Geschlechtsdrüsen sind dem seitlichen Rande genähert, so daß in der Mitte ein freier, nur von den Hoden dorsal erfüllter und später vom Uterus eingenommener Raum übrig bleibt, der etwa ein Drittel des Markparenchyms ausmacht. Der Keimstock erscheint sowohl auf Quer- als Längsschnitten als ein tiefgelapptes Organ. Der Dotterstock liegt hinter dem Ovarium, von diesem seitlich umfaßt und nimmt zugleich fast die ganze Höhe des Markparenchyms ein, wobei er aber selten die dorsale Transversalmuskulatur berührt. Die Schalendrüse zeigt keine besonderen Eigentümlichkeiten. Was nun die Zusammenmündung der Geschlechtsgänge anbetrifft, so hat Diamare seine frühere falsche Darstellung in seiner zweiten Arbeit korrigiert, doch halte ich eine etwas weniger schematische und vollständigere Darstellung der Verhältnisse für nicht unnötig (s. Fig. 5).

Die Kürze des Keimleiters ist keineswegs etwas für *P. carrinoi* Charakteristisches, sondern findet sich bei vielen Anoplocephaliden und auch bei *Moniezia*. Das Receptaculum seminis ist sehr groß und enthält, wie auch Diamare gesehen, immer zahlreiche Eizellen. Nach dem Rande zu setzt sich dasselbe als starkwandige Vagina fort, welche, wie ich bereits anderwärts schon gesagt, in derselben Proglottis auf der einen Seite unter, auf der anderen über dem Cirrusbeutel in die Genitalkloake einmündet. Zum Beweise dieser von Diamare als „Geburt der Phantasie" bezeichneten Angabe stelle ich hier die Zeichnung eines einzelnen Querschnittes dar, auf welchem die obengenannte Disposition, ohne daß ein Irrtum möglich, deutlich sichtbar ist. Es zeigt also *P. carrinoi*, wie später näher besprochen werden soll, dieselbe eigentümliche und systematisch wichtige Disposition der Genitalwege, wie solche bei *Moniezia* konstatiert worden ist. Der Uterus legt sich als hufeisenförmig gekrümmter, nach hinten offener Zellstrang an, welcher die sämtlichen weiblichen Geschlechtsdrüsen umfaßt (s. Fig. 1). Bei der Füllung mit Eiern wird er zunächst schlauchförmig, mit einigen Ausbuchtungen versehen, die aber größtenteils verschwinden, so daß er, gefüllt mit Eiern, quersackförmig rittlings — nicht auf dem Dotterstock, wie Diamare unrichtig sagt und zeichnet — sondern auf dem dauernd bestehenden Receptaculum seminis sitzt (Fig. 2 u. 3). Es bleiben in den Geschlechtsorganen außerdem nur noch der Cirrusbeutel und der Endteil der Vagina bestehen. Die beiden Uteri bleiben durch eine dünne Wandung getrennt, doch ist es sehr wohl möglich, daß bei sehr reifen Gliedern, welche leider nicht vorliegen, diese Parenchymwandung teilweise schwindet, wie dies bereits etwas früher bei *M. columbae* der Fall zu sein scheint (s. weiter unten). Die Eier sollen nach Diamare eine Hülle besitzen, was durchaus nicht richtig ist, indem wie bei *Moniezia* sich 3 Hüllen um den Embryo legen. Der Embryo zeigt einen Durchmesser von 0,012 mm, die äußere Schale einen solchen von 0,03 mm, während die mittlere Hülle wie bei *Moniezia* sehr dünn und gefaltet ist. Was nun den von Diamare erwähnten Zement anbetrifft, der die Eier verbinden soll, so glaube ich, daß die Bezeichnung Zement nicht zutreffend gewählt ist, indem dies wohl nichts anderes als ein flüssiges Sekret ist,

in welchem die Eier suspendiert sind und welche unter Einwirkung der Reagentien koaguliert und das Aussehen einer Kittsubstanz gewonnen hat.

Nachtrag. Ich habe nachträglich noch das Originalmaterial von Diamare ebenfalls auf Schnittserien untersucht und will hier das Resultat der Untersuchung kurz mitteilen, da es in einigen Punkten von dem oben Mitgeteilten differiert.

Zunächst fand ich auf Sagittalschnitten, daß die Vagina nicht über oder unter, sondern hinter dem Cirrusbeutel in die Genitalkloake ausmündet, um dann aber sofort meist unter, seltener über demselben nach innen zu verlaufen. Es scheint also hier die gegenseitige Stellung der Vagina und des Cirrusbeutels eine andere zu sein als bei obigem Materiale. Ferner zeigt sich die Vagina nicht geradlinig, sondern v-förmig gebogen (s. Fig. 6) und auch stärker gebaut. Der Verlauf der übrigen weiblichen Geschlechtsgänge ist derselbe.

Die Hoden sind an den untersuchten Gliedern etwas kleiner und nehmen nur $^1/_5$ (nicht $^1/_{10}$, wie Diamare zeichnet) der Höhe des Markparenchyms ein.

Die beiden Uteri sind so genähert, daß nur eine sehr dünne Parenchymwand sie trennt, die oft nur 0,01 mm dick und deren stellenweise Resorption leicht möglich ist.

Im übrigen fand ich alle Verhältnisse so, wie ich sie oben geschildert habe. Ob wir es hier vielleicht mit verschiedenen Arten zu thun haben, kann nur durch Untersuchung eines reicheren und besser erhaltenen Materiales der typischen *Taenia Carrinoi* mit Sicherheit nachgewiesen werden.

2. *Moniezia columbae* nov. spec.

Syn. *Paronia carrinoi* Diamare ex parte.

Diese Art ist in der Taube *Ptilonopus* spec. aus Sumatra gefunden worden und wird von Diamare als identisch mit *P. carrinoi* angesehen. In nachfolgendem soll nun dieser Cestode kurz beschrieben werden, indem besonders auf die Unterschiede mit *P. carrinoi* aufmerksam gemacht wird. Allen diesen anatomischen Differenzen ist wohl nicht der Wert von Speciescharakteren beizulegen, sondern es rühren diese vielleicht zum Teil vom Kontraktions- und Erhaltungszustand her, aber es wird trotzdem mit Evidenz hervorgehen, daß wir es offenbar mit einer besonderen Art zu thun haben.

Nach Diamare ist die Tänie aus *Ptilonopus* etwas größer und namentlich breiter als die vorhergehende Species, worauf aber kein Gewicht zu legen ist. Leider habe ich wegen Schonung des Materiales nur kleine Fragmente aus den verschiedenen Körperregionen auf Schnittserien untersuchen können.

Die männlichen Geschlechtsdrüsen (ca. 200) liegen ebenfalls sehr dicht gedrängt dorsal und ist die kontinuierliche Lage nur durch die beiderseitigen Dotterstöcke unterbrochen. Das Vas deferens ist vor seinem Eintritt in den eher keulenförmigen, langgestreckten Cirrusbeutel von zahlreichen Drüsenzellen (Prostata) umgeben, welche bei der vorhergehenden Art nur wenig zahlreich sind. Der Cirrusbeutel ist 0,09 mm lang, die Vesicula seminalis größer als bei *P. carrinoi*. Er ist stark gebogen und steigt in einzelnen Proglottiden von der ventralen Seite dorsalwärts, um über den beiden Längsstämmen des Wassergefäßsystems und dem Nerven durchgehend in die Genitalkloake sich zu ergießen.

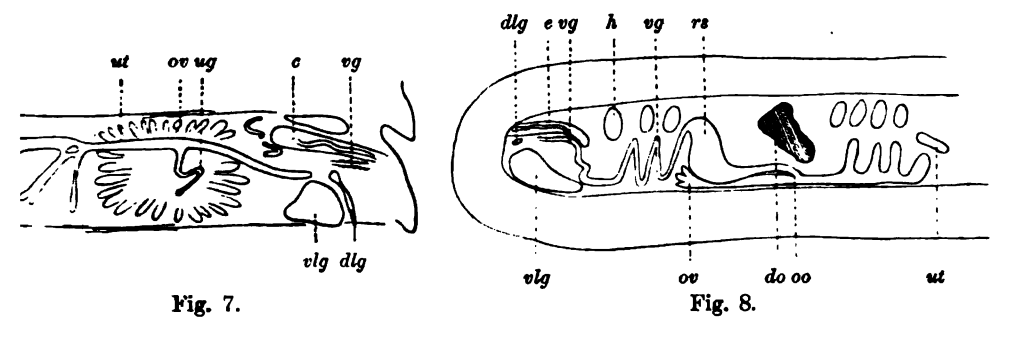


Fig. 7.

Fig. 8.

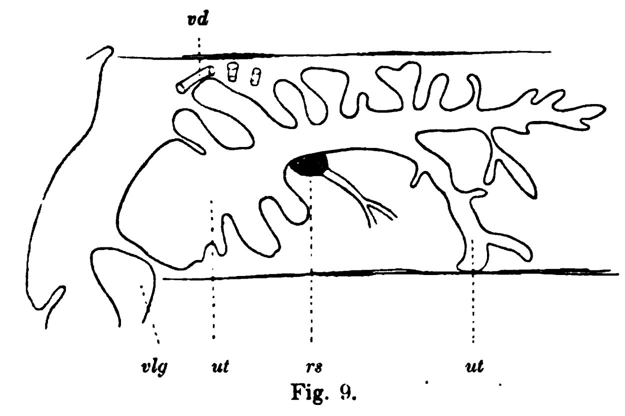


Fig. 9.

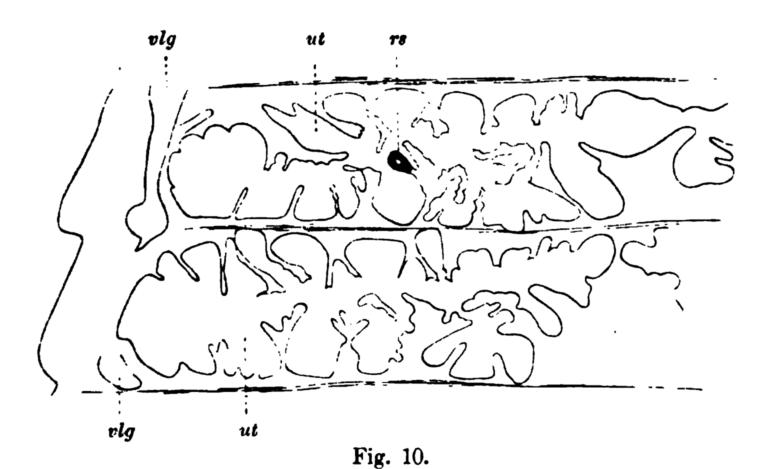


Fig. 10.

Fig. 7. Horizontalschnitt durch eine junge Proglottis (rechte Hälfte). *ov* Ovarium, *ug* Uteringang, *ut* Uterus, *c* Cirrusbeutel, *vg* Vagina, *vlg* ventrales Längsgefäß, *dlg* dorsales Längsgefäß.

Fig. 8. Querschnitt durch eine junge Proglottis (linke Hälfte). Bezeichnungen wie in Fig. 7. *rs* Receptaculum seminis, *ds* Dottersack, *oo* Ookapt, *h* Hoden.

Fig. 9. Horizontalschnitt durch eine ältere Proglottis (linke Hälfte). Bezeichnungen wie in Fig. 6 und 7. *vd* Vas deferens.

Fig. 10. Horizontalschnitt durch zwei reife Proglottiden (linke Hälfte). Vordere Proglottis zeigt die Verschmelzung der Uteri.

Die weiblichen Geschlechtsdrüsen haben dieselbe Form, doch liegt das Ovarium etwas weiter vom Längsgefäß entfernt, was der starkwandigen Vagina erlaubt, zahlreiche Schlingen zwischen dem Ovarium und den Längsstämmen des Wassergefäßsystems zu bilden, bevor sie in die Genitalkloake gelangt, während bei *P. carrinoi* die Vagina fast geradlinig zum Rande verläuft. Außerdem scheinen die Eischläuche des Ovariums nur bis halbe Höhe des Markparenchyms zu reichen, so daß die Hoden ohne Formveränderung über dasselbe weggehen, was bei der vorhergehenden Art nicht der Fall war. Der Dotterstock liegt der Dorsalfläche genähert und berührt mit fast seiner ganzen Breite die dorsale Transversalmuskulatur, während das kleinere Receptaculum seminis nie so weit hinaufreicht, im Gegensatz zu *P. carrinoi*.

Die Verschiedenheit aber, auf welche ich besonderes Gewicht lege und welche für sich allein die Verschiedenheit von *T. columbae* und *P. carrinoi* ohne weiteres beweist, ist der Bau des Uterus.

Schon die Anlage zeigt Verschiedenheiten (s. Fig. 7), der reife Uterus aber ist ganz anders gestaltet als bei der vorhergehenden Tänie. Um dies zu verdeutlichen, stelle ich einen Horizontalschnitt durch zwei vollkommen reife Proglottiden dar, in welchen die Eier bereits ihre drei Hüllen besitzen. Man sieht hier, daß der Uterus wie bei *Moniezia* und nicht wie bei *P. carrinoi*, zahlreiche Ausbuchtungen und auch andere Form aufweist. Außerdem sehen wir, daß in der Mitte die beiderseitigen Uteri durch eine allerdings schmale Oeffnung miteinander verbunden sind. Die Verbindung der beiden Uteri geschieht also bei dieser Tänie frühzeitiger (nicht „frühzeitig", wie mich Diamare irrtümlich citiert) als bei *P. carrinoi*.

Ich glaube, daß aus dieser Beschreibung ohne weiteres die Richtigkeit meiner Behauptung, daß zwei Arten vorliegen, bewiesen ist.

3. *Moniezia ambigua* nov. spec.

Bei Bestimmung der reichen helminthologischen Sammlung des Museums von Wien hatte ich das Glück, eine dritte Art zu finden, welche mit aller wünschenswerten Deutlichkeit die von Diamare bestrittene Verbindung der beiden Uteri deutlich zeigt.

Dieselbe stammt aus dem südamerikanischen Papagei *Chrysotis amazonica* Briss. und die Untersuchung der zahlreichen Fragmente

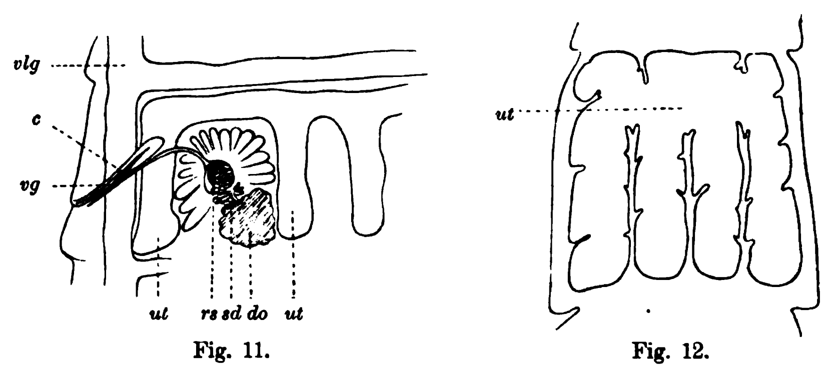


Fig. 11. Fig. 12.

Fig. 11. Horizontalschnitt durch eine junge Proglottis. Bezeichnungen wie in Fig. 7 u. 8.
Fig. 12. Horizontalschnitt durch eine reife Proglottis.

ergiebt, daß der Wurm etwa 6—8 cm lang und 1,5 mm breit wird. Die Würmer sind etwas maceriert und gestreckt konserviert, so daß die Strobila nicht so kurzgliederig erscheint, wie bei den obigen Arten. Die Geschlechtsorgane zeigen dieselbe Disposition, wie bei den anderen Arten. Der langgestreckte (0,12 mm lange) Cirrusbeutel mündet mit der fast gerade verlaufenden Vagina im letzten Drittel der Proglottis in die wenig tiefe Genitalkloake. Die zahlreichen, dorsal in einfacher Lage angeordneten Hoden sind viel kleiner als bei den anderen Arten (0,06 mm) und ihre Zahl beträgt ca. 100. Die weiblichen Geschlechtsorgane zeigen nichts besonders charakteristisches, mit Ausnahme der Uteri, die wie bei Moniezien bereits sehr früh sich vereinigen. Sobald in der Anlage des Uterus die Uterushöhle entsteht und bevor noch Eier in dieselbe getreten, zeigen sich beide an der Vorderseite der Proglottis deutlich vereinigt. In den ganz reifen Gliedern finden wir dann das ganze Markparenchym erfüllt von Eiern, nur drei schmale, sagittal von hinten nach vorn verlaufende und auf der Grenze zwischen dem ersten und zweiten Drittel aufhörende Parenchymwände bleiben bestehen.

Die Eier sind ganz gleich gebaut und ebenso groß wie bei den vorigen Arten.

Was nun die systematische Stellung der drei Cestoden und die Berechtigung der Begründung eines neuen Genus *Paronia* anbetrifft, so will ich hier zuvor nochmals den Satz wiederholen, der Diamare so in Erstaunen versetzt: „Ob dieser Vogelcestode, wie ich glaube, in das Genus *Moniezia* oder aber in ein besonderes Genus oder Subgenus zu stellen sei, darüber kann man verschiedener Meinung sein.“ In systematischen Fragen kann man sehr häufig, so auch hier, verschiedener Ansicht sein, ohne daß man deswegen immer die eine oder andere Ansicht als falsch bezeichnen kann, da ein wirklicher Beweis meist unmöglich ist.

Nicht daß Diamare eine neue Art *P. carrinoi* gefunden, ist interessant[1]), sondern was der Verfasser in seiner Arbeit übersehen oder zu erwähnen vergessen, daß diese Art eine gewissen Säugetiertänien und speziell *Moniezia* sehr nahe verwandte Form ist, ist besonderer und genauerer Besprechung wert, entgegen der Ansicht Diamare's, der glaubt, daß dies jedermann selbst, aus seiner ersten mangelhaften Beschreibung ohne besonderen Scharfsinn ersehen konnte.

Als wirklicher Unterschied zwischen *Paronia* und *Moniezia* bleibt einzig der Bau der Eier bestehen. Ich bin namentlich deshalb auf die Idee gekommen, die Arten des Genus *Paronia* in das Genus *Moniezia* zu stellen, weil bei *P. carrinoi* in überaus deutlicher Weise die Vagina in derselben Proglottis wie bei *Moniezia* auf der einen Seite dorsal, auf der anderen ventral vom Cirrusbeutel in die Genitalkloake einmündet.

Obige für *Moniezia* und *Paronia carrinoi* alleinstehende Disposition scheint mir, obwohl nicht durchgreifend, von einiger Bedeutung.

In der Anordnung der Geschlechtsorgane ist kein Unterschied zu finden, der den Wert eines Genusmerkmales besäße. Diamare findet zwar, daß man „auch die Anordnung der Hoden, Eigentümlichkeiten an den Genitalien, Kalkkörperchen! u. s. w. beachten muß“; wären aber hier wirkliche Unterschiede vorhanden, so sollten diese in der Genus-

1) Da von den 11000 existierenden Vogelarten nur in etwa 480 Cestoden gefunden wurden, so sind noch Dutzende von neuen Arten mit Sicherheit zu erwarten; in den von mir untersuchten Materialien habe ich bis jetzt 106 neue Arten gefunden.

diagnose Diamare's stehen. Ich kann also direkt zur Besprechung des Baues des Uterus übergehen. Hier will ich zunächst bemerken, daß in ganz reifen, sich ablösenden und abgelösten Gliedern häufig noch große Veränderungen vorgehen können, wie solche z. B. bei *Nematotaenia*, *Chapmania*, *Amerina* etc. zu beobachten sind. Es ist also nicht ausgeschlossen, daß in ganz reifen und abgelösten Gliedern sich auch bei *M. carrinoi* die Uteri vereinigen können; dies ist wenigstens bei *M. columbae* und ganz besonders bei *M. ambigua* der Fall, muß demnach wegen der nahen Verwandtschaft mit *M. carrinoi* auch bei dieser Art sich einstellen, ansonst dem Bau des Uterus in diesem Falle nicht der Wert eines Genusmerkmales beigelegt werden darf. Die Verbindungsstelle der Uteri ist allerdings schmal, doch sehen wir z. B. bei *Moniezia trigonophora* Stiles, daß die Verbindungsstelle der beiden Uteri ebenfalls eng und dauernd sichtbar und daß wie bei *M. columbae* in den reifen Gliedern immer eine sehr stark eingeschnürte Stelle des Uterus in der Mitte der Proglottis bestehen bleibt. Was die Struktur des Uterus anbetrifft, so haben wir gesehen, daß derjenige von *M. columbae* ein Bindeglied zwischen dem fast sackförmigen von *M. carrinoi* und dem reichverzweigten Uterus der Moniezien darstellt, wie es besser nicht gefunden werden könnte. *M. ambigua* dagegen schließt sich in der Form des Uterus an *M. carrinoi* an, zeigt dagegen wie bei Moniezien eine weite Verbindungsöffnung zwischen deu beiden Uteri. Außerdem sehen wir bei dieser Art die Vereinigung der Eibehälter sich wie bei *Moniezia* schon sehr frühzeitig herstellen, während dies bei *M. columbae* erst sehr spät, bei *M. carrinoi* wohl noch später der Fall ist. Aus obigem ist zu ersehen, daß die Genusdiagnose von Diamare dahinfällt, und wenn man das Genus *Paronia* nicht einzig auf die Struktur der Eier begründen will, was wohl nicht angezeigt ist, muß dasselbe als überflüssig gestrichen werden. Alle übrigen Verhältnisse sind bei den beiden aus Vögeln und Säugetieren stammenden Cestodengruppen dieselben oder doch wenigstens so wenig verschieden, daß eine gute Differentialdiagnose von *Paronia* und *Monizia* nicht aufzustellen ist. Die im vorhergehenden beschriebenen Arten sind also in das Genus *Moniezia* zu stellen, obwohl dasselbe dadurch vielleicht etwas von seiner Homogenität verliert.

4. *Bertia delafondi* (Railliet)[1].

Syn.: *T. delafondi* Railliet.
T. sphenocephala Rud. (Megnin, Linstow) ex parte.

Diese interessante Tnie bewohnt den Darm von *Columba livia*, *C. livia* var. *dom.* und soll nach Mégnin auch in *Columba migratoria* vorkommen[2]). Diese Vogelspecies ist wohl identisch mit *Ectopistes migratoria*, die aber nur im östlichen Nordamerika vorkommt.

Der betreffende Cestode besitzt eine Länge von ca. 14 cm bei einer maximalen Breite von 5 mm. Der Scolex mißt nach v. Linstow 0,22 mm im Durchmesser, die Saugnäpfe haben einen solchen von 0,053 mm; Rostellum und Haken fehlen. Die Strobila ist sehr kurzgliederig. Auf Grund der Untersuchung des Originalmateriales, das ich der Güte von

1) Fuhrmann, O., Bemerkung über einige neuere Vogelcestoden. (Centralbl. f. Bakt. etc. Abt. I. Bd. XXIX. 1901. No. 19. p. 759; daselbst auch Litteraturangaben.) — Linstow, O. v., Beobachtungen an Vogeltänien. (Centralbl. f. Bakt. etc. Bd. XII. 1892. p. 502.)

2) Habe jüngst denselben Cestoden in *Crossophthalamus gymnophthalamus* (Brasilien) gefunden.

Prof. Railliet (Alfort) verdanke, sowie eines Exemplares. welches aus der Sammlung des Museums für Naturkunde in Berlin (Glas No. 1959) stammte, kann ich folgende kurze anatomische Beschreibung geben.

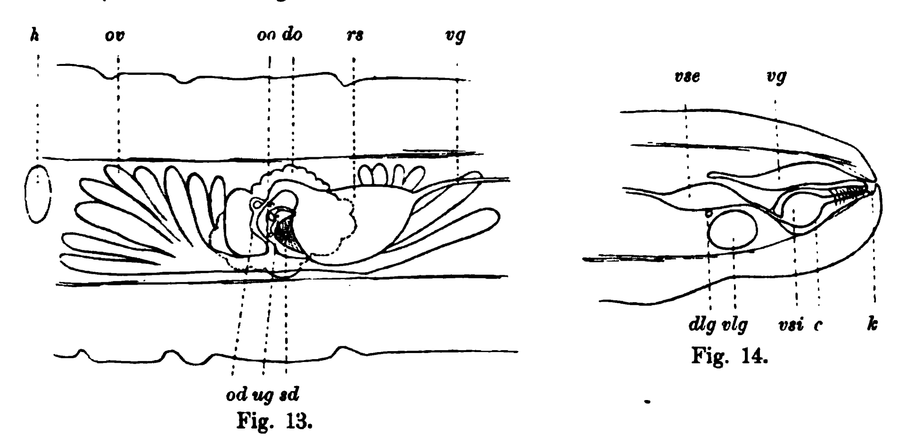


Fig. 13.

Fig. 14.

Fig. 13. Teil eines Querschnittes durch eine Proglottis. *ov* Ovarium. *do* Dotterstock, *sd* Schalendrüse, *oo* Ookapt, *od* Ovidukt, *ug* Uteringang mit Eizellen, *rs* Receptaculum seminis, *vg* Vagina, *h* Hoden.

Fig. 14. Seitlicher Teil eines Querschnittes. *c* Cirrus, *vsi* Vesicula seminalis interna, *vse* Vesicula seminalis externa, *vg* Vagina, *k* Kloake, *vlg* ventrales Längsgefäß, *dlg* dorsales Längsgefäß.

Die Parenchymmuskulatur besteht, auf Querschnitten gesehen, zunächst aus Längsmuskelbündeln, welche das ganze Rindenparenchym bis in die Nähe der Subcuticularzellen erfüllen. Die Muskelfasern sind sehr fein, die Bündel überaus zahlreich. Die am meisten nach innen, den Transversalfasern am nächsten gelegenen Bündel, sind am stärksten, außerhalb derselben finden sich bedeutend schwächere Muskelbündel, welche nach der Peripherie zu rasch an Stärke abnehmen und dann nur aus ganz wenigen, oft einzelnen Fasern bestehen. Diese äußersten Fasern und kleinen Faserbündel sind wohl nur vom Hinterrand der Proglottis aus nach der Cuticula ausstrahlende Längsfasern, wie solche sich häufig namentlich bei Anoplocephaliden finden. Bei Bertien sollen zwar im allgemeinen 2 Zonen von Längsmuskelbündeln bestehen, doch ist das nicht immer der Fall, so z. B. bei *B. obesa* Zschokke, wo die Längsmuskulatur aus mehreren konzentrischen Bündelreihen besteht, wobei die am meisten nach innen gelegenen die umfangreichsten sind. Die Transversalmuskulatur ist gut entwickelt, weniger die Dorsoventralfasern.

Die Kalkkörperchen sind wenig zahlreich und messen ca. 0,009 mm. Das Wassergefäßsystem besteht aus 4 Längsgefäßen, von welchen die beiden ventralen sehr weit und dünnwandig, ganz lateral im Markparenchym gelegen sind; ein starkes Quergefäß verbindet sie. Dorsal von ihnen, etwas nach innen verschoben, liegt das dorsale Exkretionsgefäß das sehr eng und starkwandig ist. Außerhalb dieser Längsgefäße, zwischen sie und die laterale Grenze des Markparenchyms gedrängt, liegen die beiden Längsnerven. Die Begleitnerven konnten wegen des wenig guten Erhaltungszustandes und des wenigen Materiales, das mir zur Verfügung stand, nicht gefunden werden.

Die Geschlechtsorgane zeigen die für Bertien typische Dispo-

sition, sie münden unregelmäßig abwechselnd links und rechts, selten mehr als 12mal nacheinander auf derselben Seite aus. Der männliche Geschlechtsapparat besteht aus einer großen Zahl von Hoden, welche ca. 90 an der Zahl, das Markparenchym erfüllen. In unmittelbarer Nähe der weiblichen Geschlechtsorgane liegen sie dorsal und in einfacher Lage, seitlich aber erfüllen sie das ganze Markparenchym. Sie sind auf Querschnitten oval oder kreisförmig und messen bis 0,09 mm im Durchmesser (nach Linstow 0,035 mm). Die Vasa efferentia vereinigen sich zu einem Vas deferens, das sehr weit und kurz vor der Einmündung in den Cirrusbeutel eine äußere Vesicula seminalis bildet. Was nun die Struktur des Kopulationsorganes anbetrifft, so kann ich die von Linstow gemachten Angaben nicht ganz bestätigen (Linstow, p. 503 loc. cit.). Das Vas deferens, sowie die Vagina gehen über den Längsgefäßen des Exkretionssystems und den Längsnerven durch. Ersteres mündet in einen kleinen (0,18 mm langen) birnförmigen Cirrusbeutel, der kaum bis an die Längsgefäße heranreicht und von einer schwachen Muskellage gebildet wird. Kurz nach dem Eintritt bildet das Vas deferens eine Vesicula seminalis interna, welche die halbe Länge des Cirrusbeutels einnimmt. Aus ihr entspringt der ohne Schlingenbildung direkt zur männlichen Geschlechtsöffnung verlaufende (ca. 0,09 mm lange) starkwandige Cirrus. Der Cirrus fehlt also nicht, wie Linstow annimmt, kann sich aber nur durch starke Kontraktion der Penistasche und auch dann nur sehr wenig ausstülpen, wie ich solches beobachtet habe. Er ist, wie bei vielen Cestoden, mit nach außen gerichteten Borsten ausgekleidet, welche bei ausgestülptem Zustande wie immer nach hinten gerichtet sind. Der Cirrusbeutel und Cirrus zeigen also einen ähnlichen Bau wie bei *T. capitellata*[1])

Von den weiblichen Geschlechtsorganen besteht das Ovarium aus einer großen Zahl, auf Quer- und Flächenschnitten fächerförmig angeordneten Eischläuchen, die sich in einen ganz ventral gelegenen transversal verlaufenden unpaaren Querschlauch ergießen, aus welchem die reifen Eizellen durch einen Ookapt aufgesaugt und in den Keimgang gepreßt werden. Das Ovarium zeigt in reifen Gliedern eine Breite von ca. 0,95 mm und liegt immer dem die Geschlechtsöffnung tragenden Proglottidenrande genähert und zwar (bei einer Breite der Proglottis von 3,6 mm) dem letzteren um ca. 0,75 mm näher, als dem entgegengesetzten Rande. Der Dotterstock ist in Bezug auf das Ovarium median und hinter demselben gelegen; er ist eine schwach gelappte, ca. 0,28 mm breite, fast die ganze Höhe des Markparenchyms erfüllende Drüse. Die weiblichen Geschlechtsgänge zeigen nichts Besonderes. Der Keimgang entspringt auf der Dorsalseite des unpaaren medianen Verbindungsschlauches mit einem muskulösen Schluckapparat. Kaum in halber Höhe des Markparenchyms angelangt, also sehr nahe dem Keimstock gelegen, mündet die Vagina ein. Der Ovidukt geht unter wenigen Windungen zur Schalendrüse, von wo er als Uteringang weiter verlaufend, in den Uterus einmündet. Der genaue Verlauf des Oviduktes und Uteringanges konnte aus dem schon obenerwähnten Materialmangel nicht näher eruiert werden. Die Vagina, die also wie bei *Moniezia* (*Paronia*) und bei vielen Bertien sehr nahe dem Ovarium in den Keimgang mündet, erweitert sich sofort zu einem großen Receptaculum seminis (0,31 mm lang), welches sich dann zur Vagina verengt, die aber gegen den Rand zu wieder

1) Fuhrmann, O., Beitrag zur Kenntnis der Vogeltänien I. (Revue suisse de Zoologie. T. III. 1895. p. 433.)

ziemlich weit wird, ohne aber ein zweites deutliches Receptaculum seminis zu bilden. Sie geht, wie auch das Vas deferens, über den beiden Längsstämmen des Wassergefäß- und Nervensystems durch, um in die kleine Kloake zu münden. Die Vagina verlief bei allen (mit einer Ausnahme) untersuchten Querschnitten dorsal vom Cirrusbeutel zur Kloake, wie solches auch bei vielen Bertien beobachtet worden ist. Die Genitalkloake, die übrigens auch bei anderen Bertien sehr klein, mündet durch eine äußerst enge Oeffnung nach außen. Dieselbe ist so eng, daß sie auf Querschnitten leicht übersehen werden kann. Diese Eigentümlichkeit der Genitalkloake läßt vermuten, daß, wie bereits Linstow bemerkt, die Tänie sich meist selbst befruchtet, da auch der Penis sich nur wenig auszustülpen vermag.

Der Uterus stellt anfangs ein quer die ganze Proglottis durchlaufendes Rohr dar; doch bald bildet es nach vorn und hinten zahlreiche Ausbuchtungen. In vollkommen reifen Gliedern erfüllt er das ganze Markparenchym und sind dann die Ausbuchtungen des Uterus sich so nahe gerückt, daß die Zwischenwände sehr dünn werden. Außer dem lateralen Anfang der Geschlechtsgänge bleibt immer das große, ca. 0,3 mm im Durchmesser messende Receptaculum seminis bestehen. Die Eier waren leider nicht ganz reif und besaßen nur zwei Hüllen. Ein eiförmiger Apparat, wie es sich bei vielen, aber nicht bei allen Bertien findet, scheint sich nicht entwickeln zu wollen. In der ganzen oben gegebenen Beschreibung findet sich nicht ein einziger Charakter, der den Ausschluß dieser Vogeltänie aus dem Genus *Bertia* erlaubte.

5. *Aporina alba* nov. gen. nov. spec.

Diese überaus interessante Art erhielt ich, wie schon so manche andere merkwürdige Cestodenform, durch die gütige Vermittelung von Herrn Prof. Parona in Genua.

Sie stammt aus dem Papagei *Pyrrhura* spec., der in Coxipà (Cuyabà) in Brasilien erlegt wurde.

Die weiße Strobila nimmt nach hinten regelmäßig an Breite zu, sie ist ca. 11 cm lang und hinten 4 mm breit. Die Glieder sind sehr kurz und immer mehrfach breiter als lang. Die Parenchymmuskulatur ist sehr mächtig entwickelt und besteht aus mehreren Lagen von kleinen Muskelbündeln. Dieselben sind nicht deutlich voneinander getrennt, sondern erfüllen dicht gedrängt das ganze Rindenparenchym. Die den stark entwickelten Transversalmuskeln zunächst gelegenen bestehen in den geschlechtsreifen Proglottiden aus ca. 30 Fasern außerhalb dieser Lage, welche mit ca. 22 und dann eine solche mit ca. 12 Fasern. Zuäußerst liegen mehrere Lagen von einzelnen Muskelfibrillen. Diese letzteren sind nichts anderes als die nach der Cuticula ausstrahlenden Längsfasern. Zwischen diesen Längsmuskelbündeln liegen viele große (0,023 mm) Zellen, welche multipolären Ganglienzellen sehr ähnlich, wohl aber Myoblasten sind. Die dorsoventrale Muskulatur besteht aus starken Fasern, die dicht gedrängt, überall da wo keine Geschlechtsorgane sind, das Markparenchym erfüllen. Ihre Myoblasten bilden eine deutliche median im Markparenchym verlaufende Zelllage. Im Parenchym finden sich Kalkkörperchen ziemlich zahlreich, namentlich im Markparenchym.

Das Wassergefäßsystem besteht in den Proglottiden aus zwei gewöhnlich übereinanderliegenden jederseits verlaufenden Längsgefäßen, von welchen das ventrale viel weiter ist, als das dorsale. Die ersteren

sind durch ein äußerst weites Verbindungsgefäß vereinigt, das namentlich in der Mitte durch seine starke Entwickelung das Markparenchym stark reduziert.

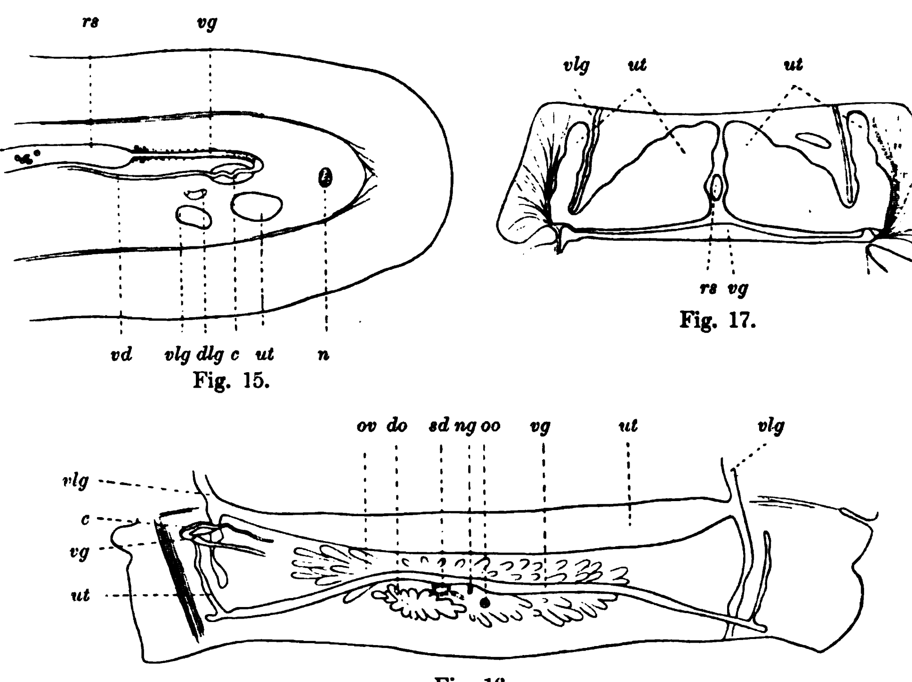


Fig. 15. Seitlicher Teil eines Querschnittes. *vg* Vagina. *c* Cirrus, die sich, ohne nach außen zu münden, direkt vereinigen. *rs* Receptaculum seminis, *utv* Uterusast außerhalb des Wassergefäßsystems gelegen, *vlg* ventrales Längsgefäß, *dlg* dorsales Längsgefäß.

Fig. 16. Horizontalschnitt durch eine junge Proglottis. Bezeichnungen, wie in Fig. 15. *ov* Ovarium, *do* Dotterstock *sd* Schalendrüse, *oo* Ookapt, *ug* Uteringang, *ut* Uterus, *vg* Verbindungsgefäß des Wassergefäßsystems.

Fig. 17. Horizontalschnitt durch eine ganz reife Proglottis, welche scheinbar doppelte Uteri zeigt, die aber auf einem folgenden Schnitt durch einen sehr feinen Kanal verbunden. *cm* Zur Cuticula ausstrahlende Längsmuskeln.

Eigentümlich für diesen Cestoden ist der vollkommene Mangel einer Geschlechtskloake und der Geschlechtsöffnungen. Die männlichen Geschlechtsorgane bestehen aus zahlreichen dorsal gelegenen Hodenbläschen, ca. 140 an der Zahl. Dieselben sind meist seitlich von den weiblichen Geschlechtsdrüsen gelegen und gehen lateral über die Längsstämme des Exkretionssystems hinaus bis an die laterale Grenze des Markparenchyms. Der Endteil des Vas deferens ist leicht sichtbar als gerader Kanal, der in den schwach entwickelten Cirrusbeutel einmündet. Derselbe liegt links oder rechts unregelmäßig abwechselnd dorsal vom Wassergefäßsystem und dem extravaskulären, später zu beschreibenden Uterusast. Der Cirrusbeutel liegt also im Markparenchym und ist ohne jegliche Verbindung mit der Außenwelt. Die Distanz zwischen ihm und dem Proglottidenrand beträgt ca. 0,456 mm; doch findet sich hier nicht wie bei der blind endigenden Vagina gewisser Acoleïnae ein Strang sich dunkel färbender Zellen, welche die frühere Existenz einer Verbindung

mit der Oberfläche der Strobila andeuten. Im schwach muskulösen 0,14 mm langen Cirrusbeutel findet sich ein wenig gewundenes, wohl kaum als Penis ausstülpbares Vas deferens. Dieses Vas deferens geht ohne Strukturveränderungen mit gleichem Durchmesser in die Vagina über, welche anfangs ziemlich muskulös zu sein scheint. Sie ist kurz (0,34 mm) und erweitert sich bald in ein langgestrecktes schlauchförmiges Receptaculum seminis. Was nun die gegenseitige Lage von Vagina und Cirrus betrifft, so liegt erstere hinter letzterem, beide dorsal von den Exkretionsstämmen.

Die weiblichen Geschlechtsdrüsen liegen dem Rande, nach welchem die Vagina geht, etwas genähert. Das Ovarium, 1,2 mm breit, ist sehr tief gelappt und erscheint auf Flächenschnitten aus Eituben zusammengesetzt, die in einem Punkte zusammenstrahlen. Auf Querschnitten aber sieht man, daß diese die ganze Höhe des Markparenchyms ausfüllenden Ovariallappen in einen ganz ventral und querverlaufenden unpaaren Eischlauch münden, auf dessen Dorsalseite in der Mitte der die Eier aspirierende Ookapt entspringt. Die Eizellen sind 0,012 mm groß, mit hellem Kern und weisen, schon im Ovarium ein an Dotterkörnern relativ reiches Protoplasma auf. Der Dotterstock liegt hinter dem Ovarium und ist ebenfalls tief gelappt und 0,34 mm breit; er nimmt auf Querschnitten nur die ventrale Hälfte der Markparenchymhöhe ein. Die Schalendrüse liegt zwischen Ovarium und Dotterstock. Die Vagina, welche, wie schon oben bemerkt, in fast gerader Linie zum Ovarium verläuft, ist in Proglottiden, welche in voller Geschlechtsthätigkeit sind, schlauchförmig 0,91 mm lang und 0,1 mm weit.

Der Uterus zeigt eine ganz typische und eigentümliche Form, welche diese Art leicht erkennen läßt. Ganz jung, zeigt er sich als ein einfacher gleichmäßig weiter Zellschlauch, der in der Mittellinie und vom Vorderrande des Proglottis links und rechts ausgehend, diagonal verlaufend, nach dem Hinterrande der Proglottis zieht. Dabei geht er über dem dorsalen und ventralen Längsstamm des Wassergefäßsystems durch, um in der extravaskulären Markparenchymzone einen dem Proglottidenrande parallel verlaufenden und natürlich nach vorn gerichteten Seitenstamm zu bilden. Mit dem Eintreten der befruchteten Eier in den Uterus wird derselbe immer weiter und bildet namentlich an den beiden äußeren, nach vorn verlaufenden Seitenzweigen kleine Ausbuchtungen, welche aber später fast vollständig verschwinden. Merkwürdigerweise bleibt der Uterus da, wo der Ovidukt in ihn mündet, dies ist in der Mittellinie, immer auf der primären Weite bestehen, so daß dann, wenn die seitlichen Teile stark sackförmig erweitert sind, zwei Uteri zu bestehen scheinen, die nur durch einen sehr engen, auf Horizontalschnittserien nur auf ganz wenigen Schnitten sichtbaren kurzen Kanal miteinander verbunden sind. Bei *Moniezia columbae* und vielleicht auch bei *M. carrinoi* haben wir zwei Uteri, welche sich in reifen Gliedern durch einen nachträglich erscheinenden Kanal verbinden, während hier ein einfacher Uterus in zwei getrennte Uteri zerfällt, welche nur durch einen schmalen, von Anfang an bestehenden Verbindungsgang vereinigt sind. Die Eier sind oval; der Embryo mit seinen 6 Haken von starker Schale umhüllt, mißt 0,02 und 0,012 mm. Die zweite Hülle, ebenfalls oval, hat folgende Durchmesser: 0,030 und 0,018 mm.

Wir hätten in dieser neuen Art den Repräsentanten eines neuen Genus vor uns, bei welchem die Autofecondation zur Regel geworden ist und jede Befruchtung zwischen verschiedenen Gliedern derselben Strobila

oder Kreuzbefruchtung zwischen verschiedenen Gliederketten, wie sie sonst häufig vorkommt, unmöglich gemacht ist.

Mein Freund Dr. Wolffhügel (Berlin) hat eine zweite Art dieses Genus in der Taube gefunden, welche dieselben Eigentümlichkeiten zeigt, anatomisch der *Bertia Delafondi* sehr ähnlich, ohne aber mit ihr identisch zu sein. Diese Tänie besitzt, wie ich mich bei Besichtigung der Präparate überzeugen konnte, einen Scolex ohne Rostellum und Haken, so daß wir es also wirklich mit einem Anoplocephaliden zu thun hätten. Die Diagnose für das neue Genus können wir also folgendermaßen formulieren: Anoplocephaliden mit einfachem Geschlechtsapparat, die weiblichen Geschlechtsorgane sind dem Proglottidenrande, nach welchem die Vagina zieht, genähert. Die Hoden sind sehr zahlreich, erfüllen die dorsale Seite des ganzen Markparenchyms. Die Vagina und der rudimentäre Cirrus münden nicht nach außen, sondern vereinigen sich im Markparenchym (dorsal von den Längsstämmen des Wassergefäßsystems) — Eier mit 2 Schalen.

6. ***Zschokkia linstowi*** (Parona) nov. gen.

Syn. *T. linstowi* Parona 1885 [1]).
Hymenolepis linstowi Parona 1900 [2]).
Linstowia linstowi (Parona) 1901 [3]).

Die nachfolgende kurze Beschreibung dieser interessanten Art ist auf Grund der Untersuchung des aus *Numida ptilorhyncha* stammenden Originalmateriales gemacht, das ich der Güte von Herrn Prof. Parona verdanke.

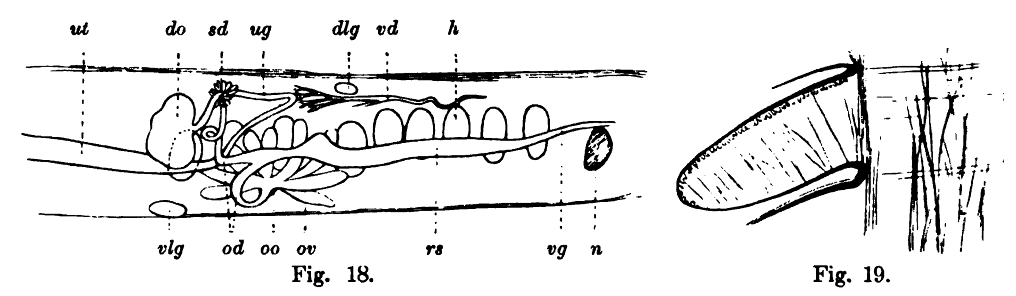


Fig. 18. Fig. 19.

Fig. 18. Querschnitt durch die weiblichen Geschlechtsorgane nach drei Schnitten rekonstruiert.
ov Ovarium, *do* Dotterstock, *sd* Schalendrüse, *oo* Ookapt, *od* Ovidukt, *ug* Uteringang, *ut* Uterus, *rs* Receptaculum seminis, *vg* Vagina, *vd* Vas deferens, *h* Hoden, *vlg* ventrales Längsgefäß, *dlg* dorsales Längsgefäß, *n* Nerv.

Fig. 19. Teil eines Horizontalschnittes, die Disposition der Längsmuskelfasern zeigend. (S. Text.)

Der Scolex dieser Art besitzt einen Durchmesser von 0,9 mm, mit kreisrunden Saugnäpfen von 0,34 mm. Das von Prof. Parona als Rostellum gedeutete Gebilde ist einfach eine Vorwölbung des Scheitels.

1) Parona, C., Di alcuni elminti raccolti nel Sudan orientali. (Annali del Museo civico Ser. 2a, Vol. II. Genova 1885.

2) Parona, C., Helminthum ex Conradi Paronae Museo. Cestodes. Genova 1900.

3) Fuhrmann, O., Bemerkungen über einige neuere Vogelcestoden. (Centralbl. f. Bakt. u. Parasitenkunde. Bd. XXIX. Abt. I. 1901. p. 760.)

Die Strobila mißt an den mir zur Verfügung stehenden, nicht vollkommen entwickelten Exemplaren 5 cm. Parona giebt eine solche von 13—15 cm an, was sich vielleicht auf die nachfolgend beschriebene *Linstowia lata* bezieht. Die Breite ist 4 mm im Maximum. Die Glieder sind sehr kurz und breit, nur die letzten werden etwas länger. Der Hals ist sehr kurz, die Strobilation ist aber sofort eine sehr deutliche, während die erste Anlage der Geschlechtsorgane ziemlich weit hinter dem Scolex liegt und deren Entwickelung eine sehr langsame ist. Was nun die Anatomie anbetrifft, so sehen wir zunächst, daß das Rindenparenchym ungemein stark entwickelt, indem es bei einer Dicke der Proglottis von 0,9 mm eine solche von 0,35 mm besitzt. Dasselbe ist vollkommen erfüllt von Längsmuskelfasern, welche in schwache Muskelbündel angeordnet, ohne aber deutliche Muskellagen zu bilden. Die äußerten Fasern strahlen nach vorn zur Cuticula aus. Außerdem finden wir noch zahlreiche kurze Längsfasern, welche von der hinteren peripheren Proglottidenfläche zur vorderen verlaufen und welche wohl von der kontinuierlichen Längsmuskulatur abstammen. Bemerkenswert ist vielleicht noch, daß an eben dieser durch die tiefe Einschnürung der Strobila gebildeten freien Hinterfläche der Proglottiden fast keine Subcuticularzellen der dicken Cuticula anliegen. Die Transversal- und Dorsoventralmuskulatur ist ziemlich gut entwickelt.

Das Wassergefäßsystem zeigt mehrere Eigentümlichkeiten; zunächst sind die beiden Längsstämme sehr weit nach innen verlegt, außerdem findet sich das ventrale Gefäß in Bezug auf das dorsale nach innen verschoben, wie dies auch im Genus *Linstowia* der Fall ist. An Stelle des ventralen Quergefäßes finden wir ein feines Netz von Kapillaren, welches aber nicht nur die beiden ventralen Gefäße miteinander verbindet, sondern auch die beiden dorsalen und am Rande immer an der Peripherie des Markparenchyms verlaufend, auch die ventralen Längsgefäße in gleicher Weise mit den dorsalen vereinigt. So entsteht ein vollkommen peripher gelegenes Gefäßnetz, welches die Geschlechtsorgane umschließt. Erwähnenswert ist vielleicht noch, daß im Vorderteil der Strobila die beiden Längsgefäße übereinander liegen. Das dorsale Gefäß ist auch hinten nur wenig enger als das ventrale Längsgefäß.

Vom Nervensystem habe ich nur die beiden mächtigen Längsnerven beobachtet, die etwa in der Mitte zwischen dem dorsalen Längsgefäß und dem Proglottidenrande verlaufen.

Die männlichen Geschlechtsorgane bestehen aus einem kurzen (0,13—0,16 mm) walzenförmigen Cirrusbeutel mit kurzem Penis. Am inneren Ende der schwach muskulösen Penistasche liegt eine kleinere Vesicula seminalis. Vom Cirrusbeutel aus geht das Vas deferens in kurzen Schlingen zu den der dorsalen Seite genäherten Hodenbläschen, deren Zahl ungefähr 140 beträgt. Sie finden sich auch außerhalb der weiblichen Geschlechtsorgane bis in die Nähe der Längsnerven und sind mit den median gelegenen Hoden durch eine Reihe solcher verbunden, die hinter den Organen des anderen Geschlechtes durchzieht. Die Vasa efferentia sind leicht sichtbar und bilden zahlreiche Anastomosen.

Die weiblichen Geschlechtsorgane zeigen die Eigentümlichkeit zwischen den beiden Längsgefäßen des Exkretionssystems zu liegen. Da deren gegenseitige Distanz nur 0,3 mm beträgt, sind die Geschlechtsorgane natürlich relativ klein. Wegen der großen Kürze der Proglottiden liegen das Ovarium und der Dotterstock fast vollkommen nebeneinander, ersteres dem Vorderrande, letzteres dem Hinterrande ge-

nähert. Der Dotterstock mit einem Breitendurchmesser von 0,12 mm liegt größtenteils über dem ventralen Längsgefäß; auf fast gleicher Höhe neben ihm findet das 0,20 mm breite Ovarium seinen Platz. Es ist tief gelappt und die nach dem Rande des Gliedes gerichteten Eiröhren gehen unter dem dorsalen Längsgefäß durch und überschreiten etwas den äußeren Rand desselben. Der Ovidukt beginnt mit einem Oocapt; der Verlauf desselben, sowie des Uterin- und Dotterganges ist am besten aus beistehender Figur 18 zu ersehen. Die Schalendrüse ist dorsal gelegen. Die Vagina verläuft in gerader Linie zur flachen Genitalkloake, dabei geht sie wie das Vas deferens unter dem dorsalen Längsgefäß und über dem Längsnerven durch. Die Vagina bildet im Markparenchym ein langgezogenes spindelförmiges Receptaculum seminis; sobald die Vagina den Längsnerven überschritten, erweitert sie sich zu einem ziemlich weiten muskulösen Schlauch, der sich kurz vor seiner Ausmündung verengert. Der Uterus bildet anfangs ein median verlaufendes, leicht gewelltes Rohr, das beiderseits bis an die Längsnerven reicht. Seine Wandung verschwindet bald und werden die Eier ins Parenchym gestoßen. Die Entwickelung und Bildung der Parenchymhüllen der Eier konnte ich aus Mangel an Material nicht verfolgen.

Diese Art nähert sich durch die starke Entwickelung des Markparenchyms, die Disposition der Längsstämme des Wassergefäßsystems und das Verschwinden der Uteruswand dem Genus *Linstowia*. Die eigentümliche Entwickelung des Exkretionsgefäßsystems, der schwache Cirrusbeutel, die eigentümliche Lage der weiblichen Geschlechtsorgane zwischen den Längsgefäßen, der Verlauf der Vagina und des Vas deferens unter dem dorsalen Längsgefäß und über dem Längsnerven durch, entfernen diese Art von obigem Genus.

Im Gegensatz zu meiner früheren Ansicht (loc. cit. p. 760) scheint es mir nötig, ein neues Anoplocephalidengenus aufzustellen, das ich nach meinem verehrten Lehrer, Herrn Prof. Zschokke (Basel), der sich speziell mit dieser Cestodengruppe eingehend beschäftigt, benenne. Die Diagnose des Genus *Zschokkea* lautet folgendermaßen: Glieder viel breiter als lang; Rindenparenchym und Muskulatur sehr stark entwickelt; Genitalpori einseitig. Die dorsalen Exkretionsstämme nach außen von den ventralen gelegen und untereinander durch ein feines peripheres Kapillarnetz verbunden. Die Geschlechtskanäle ziehen unter dem dorsalen Wassergefäßstamm und über dem Längsnerven durch zur Genitalkloake. Cirrusbeutel schwach; Hoden dorsal durch die ganze Proglottis verteilt. Weibliche Drüsen seitlich zwischen dem dorsalen und ventralen Längsgefäß der einen Seite gelegen. Uterus verliert seine Wandung bald und die Eier treten ins Parenchym über.

7. *Linstowia lata* nov. spec.

Diese Art stammt aus demselben Materiale wie die vorhergehende, wurde also auch in *Numida ptilorhyncha* gefunden.

Das größte mir zur Verfügung stehende Exemplar maß 24 cm bei einer maximalen Breite von 10 mm. Diese Breite wird ungefähr in der Mitte der sehr kurzgliederigen Strobila erreicht, bis dahin nimmt die Strobila gleichmäßig an Breite zu, um dann sehr rasch abzunehmen. Die letzten Glieder sind quadratisch oder länger als breit (Länge 2,4 mm,

Breite 1,7 mm). Der Scolex ist kleiner als bei der vorhergehenden Art und mißt 0,45 mm im Durchmesser, während die kreisrunden Saugnäpfe 0,2 mm messen.

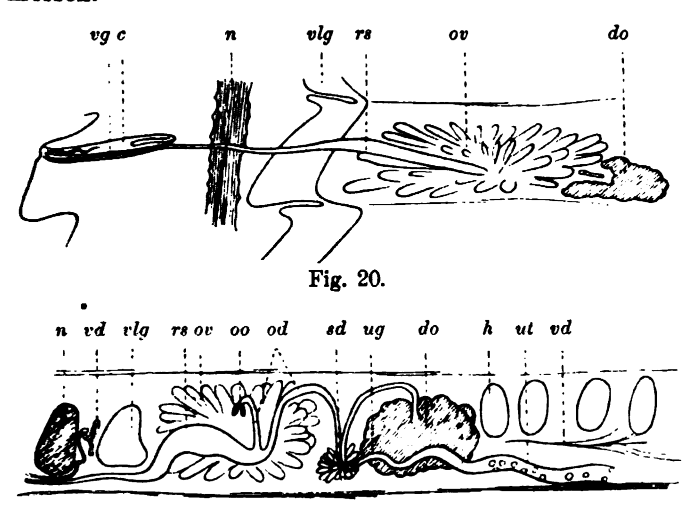


Fig. 21.

Fig. 20. Horizontalschnitt durch eine Proglottis. Bezeichnungen wie in Fig. 18. c Cirrusbeutel.

Fig. 21. Querschnitt durch eine Proglottis (Rekonstruktion). Bezeichnungen wie in Fig. 18.

Das Rindenparenchym ist wie bei *Linstowia* sehr mächtig und enthält eine sehr stark entwickelte Muskulatur, deren Fasern zu mächtigen Bündeln zusammengefaßt, die aber nicht in Zonen angeordnet sind. Die Rindenparenchymzone mißt bei einer Dicke der Proglottis von 1 mm 0,4 mm. Von den Muskelbündeln sind die innersten von besonderer Stärke, sie messen im Mittel 0,16 mm, im Höhen-, 0,045 mm im Breitendurchmesser und umfassen bis 500 feine Fasern. Die außerhalb diesen gelegenen sind viel kleiner und sind nur von 100—200 Fasern gebildet, außerhalb welcher dann zahlreiche kleine Bündel, bis an die Subcuticularzellen heranreichend, liegen. Dorsoventral- und Transversalmuskulatur sehr stark.

Das Wassergefäßsystem besteht aus zwei sehr großen, weit nach innen verlegten ventralen Gefäßstämmen, die durch ein sehr mächtiges Verbindungsgefäß vereinigt sind. Dieses Gefäß nimmt beinahe die ganze Höhe des Markparenchyms ein. Ein dorsales Gefäß konnte ich nicht finden, vielleicht daß dasselbe sehr bald atrophiert, was ich aber, da ich das Material schonen mußte, nicht nachzuweisen vermochte.

Der nicht weit nach außen vom Längsgefäß entfernt gelegene Längsnerv ist ebenfalls sehr stark und fast so dick, wie das Wassergefäß weit ist.

Die männlichen Geschlechtsorgane bestehen wie bei *Linstowia* aus einem langen (0,45 mm) schlauchförmigen Cirrusbeutel, von welchem aus ein stark gewundenes Vas deferens zu den dorsal gelegenen ovalen Hoden zieht. Die Vasa efferentia scheinen auf der ventralen Seite der Hoden zu entspringen.

Da die Glieder sehr kurz und das Transversalgefäß sehr weit, finden

wir die weiblichen Geschlechtsdrüsen nebeneinander angeordnet, der Dotterstock innerhalb des Ovariums. Beide sind stark nach der einen Seite der Strobila verschoben und liegt letzteres ganz nahe dem Wassergefäß. Das tiefgelappte Ovarium besitzt eine Breite von 0,4 mm, der Dotterstock eine solche von 0,2 mm. Beide nehmen fast die ganze Höhe des Markparenchyms ein. Ovidukt und Dottergang entspringen auf der dorsalen Seite der Drüse. Die Schalendrüse liegt ventral zwischen den beiden. Die Vagina verläuft in gerader Linie zur einseitig gelegenen flachen Genitalkloake und mündet neben dem Cirrus in dieselbe. Sie bildet im Markparenchym ein langgezogenes enges Receptaculum seminis. Der Verlauf der Geschlechtsgänge ist ein typischer, indem dieselben wie bei *Linstowia* unter dem Wassergefäß und Längsnerven durchgehen. Der Uterus, anfangs ein ventral verlaufender Schlauch, mit sehr zarter Wandung, verliert diese sehr bald und es werden dann die Eier einzeln vom Parenchym umhüllt. Die Eier erfüllen das ganze Markparenchym bis zu den Längsgefäßen. Der Embryo hat einen Durchmesser von 0,025 mm und ist von einer feinen Membran umgeben, eine zweite zarte Hülle zeigt einen Durchmesser von ca. 0,036 mm, worauf die etwas weitere Parenchymkapsel folgt, der vielleicht eine dritte Eihülle eng anliegt. Die Eikapseln liegen dicht gedrängt, sich gegenseitig berührend, im Parenchym.

Nach der obigen Beschreibung zu urteilen, ist diese Art in das von Zschokke[1]) begründete Genus *Linstowia* zu stellen. Nur das frühe Verschwinden des dorsalen Wassergefäßes und die Einseitigkeit der Geschlechtsöffnungen passen nicht in die Diagnose. Was letztere anbetrifft, so sind, wie ich schon früher bemerkt, bei gewissen aus Säugetieren stammenden Arten desselben Genus bis 90 Proz. der Geschlechtsöffnungen auf einer Seite gelegen.

8. *Cittotaenia kuvaria* (Shipley).

Syn. *Coelodela kuvaria* Shipley 1900.

Herr Prof. E. Shipley[2]) hatte die Güte, mir Schnitte, sowie ein Fragment obiger Tänie zu überlassen, nach welchen ich, obwohl das Material nicht sehr reich und auch nicht sehr gut erhalten war, versuchen will, die Art etwas näher zu beschreiben, um zugleich ihre Zugehörigkeit zum Genus *Cittotaenia* nachzuweisen.

Cittotaenia kuvaria bewohnt den Darm von *Carpophaga* van Wyki auf Karavia (New Britain). Der Wurm mißt ca. 50 mm bei einer Breite von 5 mm im Maximum. Der Kopf hat einen Durchmesser von 1 mm und trägt 4 Saugnäpfe; es fehlen ihm Rostellum und Haken.

Die Proglottiden der Strobila sind kurz und sehr breit, da wo die Geschlechtsdrüsen vollständig angelegt, 0,2 mm lang bei einer Breite von 2,5 mm.

Die Muskulatur besteht aus zahlreichen kleinen Längsbündeln, welche das ganze Rindenparenchym erfüllen (ca. 7—9 übereinander liegende Bündel), aber nicht in deutliche konzentrische Lagen angeordnet sind. Die Transversalmuskulatur ist gut entwickelt, weniger die dorsoventralen Fasern.

---

1) Zschokke, Neue Studien an Cestoden aplocentaler Säugetiere. (Zeitschr. f. wiss. Zool. Bd. LXV. 1899. p. 441.)

2) Shipley, A. E., A description of the Entozoa collected by Dr. Willey during his sejourn in the Western Pacific. (A. Willey's Zoological Results. Part V. 1900. p. 552—556. Fig. 23—26.)

Die Geschlechtsorgane erscheinen direkt hinter dem Scolex. Nach meiner Untersuchung finden wir auf der dorsalen Seite des Markparenchyms eine Lage dicht gedrängter Hodenbläschen (280 an der Zahl), welche nur undeutlich in zwei Komplexe getrennt sind. Sie gehen über die weiblichen Geschlechtsorgane weg bis an den Rand des Markparenchyms. Von ihnen gehen die deutlich sichtbaren Vasa efferentia ab, welche zahlreiche Anastomosen zeigen und so ein Netz von Kanälen bilden, welches sich in der Nähe des beiderseitigen Gliedrandes in 2 Vasa deferentia vereinigt; dieselben sind ziemlich weit, stark gewunden, aber eine deut-

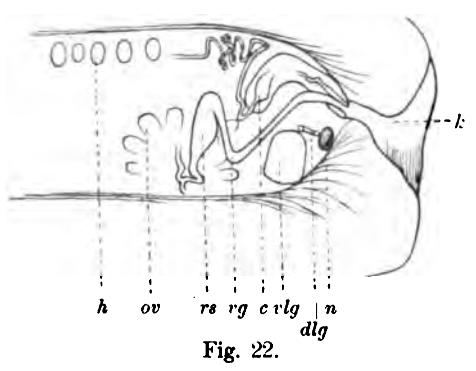


Fig. 22.

Fig. 22. Seitlicher Teil eines Querschnittes. *ov* Ovarium, *rs* Receptaculum seminis, *rg* Vagina, *h* Hoden, *c* Cirrusbeutel, *k* Kloake, *vlg* ventrales Längsgefäß, *dlg* dorsales Längsgefäß.

liche Vesicula seminalis, wie eine solche Shipley angiebt, habe ich an den mir zur Verfügung stehenden Schnittserien nicht gesehen.

Die links und rechts gelegenen Cirrusbeutel sind langgestreckt, fast cylindrisch (bis 0,3 mm lang, bei einem Durchmesser von 0,04 mm), von einer starken Muskellage gebildet. In diesen cylindrischen Muskelsack tritt das Vas deferens ein, um sofort, wie es bei Cittotänien der Fall ist, eine kleine muskulöse Vesicula seminalis zu bilden. Der hierauf folgende Teil, welcher den Cirrus bildet, der unbewaffnet erscheint, ist leicht gewunden und mündet in eine ziemlich tiefe Genitalkloake, welche etwas hinter der Mitte des lateralen Proglottidenrandes ausmündet.

Hinter dem Cirrhusbeutel mündet die starkwandige Vagina; dieselbe zeigt nirgends die von Shipley in seiner zu sehr schematisierten und zum Teil unzutreffenden Textfigur (Fig. D) gezeichneten Drüsen. Sie entspringt seitlich und verläuft dann ventral vom Cirrusbeutel, bald ein langgestrecktes Receptaculum seminis bildend. Diese Art der Lagerung findet sich übrigens auch bei Cittotänien der Säugetiere, so habe ich mich bei *Cittotaenia marmottae* selbst überzeugen können, daß die Vagina häufig hinter dem Cirrusbeutel entspringt. Der Verlauf der Geschlechtsgänge konnte leider nicht genauer festgestellt werden, so daß ich mich darauf beschränke, die Geschlechtsdrüsen, Keimstock und Dotterstock, sowie den Uterus kurz zu beschreiben. Die ebenfalls doppelten weiblichen Geschlechtsdrüsen liegen den Längsstämmen des Wassergefäßsystemes sehr genähert. Das Ovarium zeigt eine fächerförmige tiefgelappte Gestalt, während hinter ihm und ventralwärts verschoben der in seiner Gestalt einheitlichere Dotterstock liegt.

Der Uterus ist ein einfacher Schlauch und liegt zuerst dem Vorderrand der Proglottis genähert (nicht wie im Diagramm [Fig. D] Shipley's dem Hinterrand genähert) und treibt sehr bald seitliche Ausstülpungen, die mit dem Eintritt der Eier größer werden, um in ganz reifen Gliedern, wo der Uterus ein einfacher Sack ist, fast ganz verschwinden. Ueber die Struktur der Eier kann ich keine Auskunft geben.

Die ganze Beschreibung des Geschlechtsapparates stimmt vollkommen

mit dem, was wir von den Cittotänien der Nager und *Cittotaenia avicola* aus *Anas* kennen, überein, mit Ausnahme des letzten Charakters, der sich auf die mit birnförmigem Apparat versehenen Eier bezieht, die hier zu fehlen scheinen.

Besonders wichtig ist, daß auch bei *C. kuvaria* die Geschlechtsgänge ebenfalls über dem ventralen und dorsalen Wassergefäßstamme und dem außerhalb desselben gelegenen Längsnerven durchgehend zur Genitalkloake verlaufen.

Das Wassergefäßsystem (Näheres siehe Shipley, p. 553) zeigt die keineswegs systematische Wichtigkeit besitzende Eigentümlichkeit (wie dies Shipley glaubt, indem er dieselbe in seine Genusdiagnose aufnimmt), daß die ventralen Längsstämme und namentlich das Quergefäß ungemein weit ist. Außerdem zeigt das dorsale Längsgefäß, da wo die Geschlechtsgänge die Exkretionsstämme kreuzen, die Tendenz, sich zwischen das ventrale und den Längsnerven stellen, wobei ihm der Nerv entgegenkommt, indem er sich etwas dorsal verschiebt, wie dies auch bei Cittotänien der Fall ist. Es ist also nicht zutreffend, wenn Shipley in seiner Diagnose sagt: „The dorsal vessel does not reach beyond in the neck", indem dasselbe, wie wir gesehen haben, auch da, wo die Geschlechtsorgane gut entwickelt, noch sehr deutlich etwas seitlich verschoben über dem sehr weiten ventralen Gefäß verläuft. Ob es in den ganz reifen Gliedern verschwindet, kann ich nicht sagen, da ich keine solchen untersuchen konnte. Aus demselben Grunde kann ich leider nichts Näheres über die von Shipley nur kurz beschriebenen Eier aussagen.

Stiles hat das Genus in zwei Gruppen geteilt, in der einen, deren Typus *C. marmotae* ist, ist die Form des Cirrusbeutels birnförmig, in der zweiten dagegen langgestreckt, von gleichmäßigem Durchmesser. *C. kuvaria* gehört in die letztere Gruppe, deren Typus *C. pectinata* ist. Die einzige wirkliche Differenz liegt in der Struktur der Eier, doch scheint es mir nicht angethan, wegen des Fehlens des birnförmigen Apparates der Eier das Genus *Coelodoela* beizubehalten, um so mehr, als es nicht sicher ist, daß Shipley ganz reife Eier vorgelegen haben.

9. *Cittotaenia avicola* Fuhrmann.

Diese aus *Anas* spec. stammende typische *Cittotaenia* gehört, nach dem Bau der Geschlechtsorgane zu urteilen, in die Gruppe der *Cittotaenia marmotae*, nach der Form des Cirrusbeutels aber in die der *C. pectinata*. Für nähere anatomische Details verweise ich auf meine früher erschienene Arbeit: Sur un nouveau Ténia d'oiseau (Revue suisse de zoologie. T. V. 1897. p. 107—117. Taf. 5).

10. *Taenia anoplocephaloides* nov. spec.

Obwohl der Scolex fehlt und ich also nicht mit Sicherheit angeben kann, ob ein Rostellum und Haken vorhanden oder nicht, so scheint es mir doch, nach der Disposition der Muskulatur und der Struktur des Geschlechtsapparates zu urteilen, daß wir es hier ebenfalls mit einem Anoplocephaliden zu thun haben.

Der Cestode wurde in *Psittacus erythacus* gefunden und wurde mir von dem Direktor des Museums in Stuttgart gütigst überlassen.

Der Wurm erreicht eine Länge von 12 cm bei einer maximalen Breite von 3—4 mm. Die Strobila ist sehr kurzgliederig, mit Ausnahme der letzten Proglottiden, die etwas länger bis quadratisch werden können.

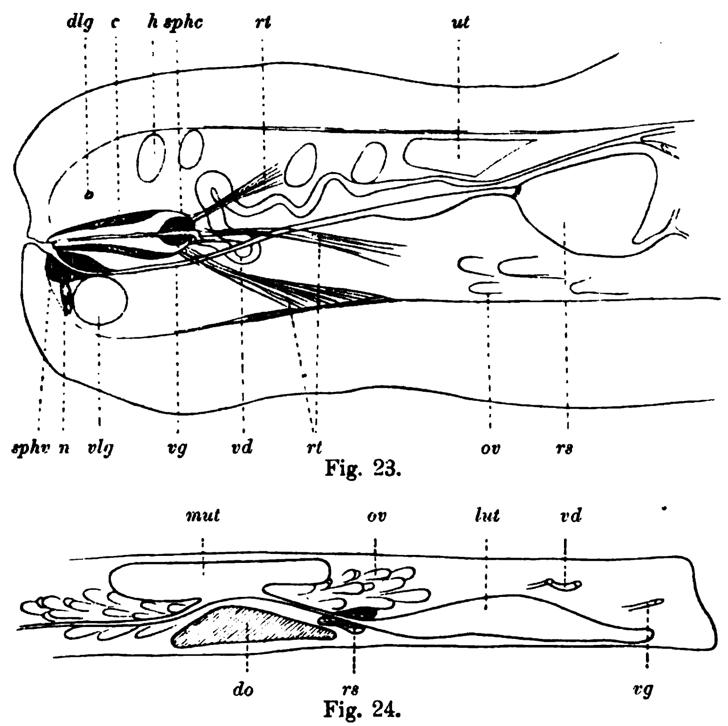


Fig. 23.

Fig. 24.

Fig. 23. Seitlicher Teil eines Querschnittes. *vg* Vagina, *sphv* Sphinkter der Vagina, *rs* Receptaculum seminis, *ov* Ovarium, *ut* Uterus, *c* Cirrusbeutel, *sphc* Sphinkter des Vas deferens, *rt* die 3 Retraktoren des Cirrusbeutels, *h* Hoden, *vd* Vas deferens, *vlg* ventrales Längsgefäß, *dlg* dorsales Längsgefäß, *n* Nerv.

Fig. 24. Horizontalschnitt durch eine junge Proglottis (das linke Drittel ist nicht gezeichnet). Bezeichnungen wie in Fig. 23. *mut* medianer Teil des Uterus, *lut* lateraler Teil des Uterus.

Fig. 25. Horizontalschnitt durch eine ganz reife Proglottis. Bezeichnungen wie in Fig. 24.

Die Muskulatur erfüllt das ganze Rindenparenchym. Die Längsmuskulatur ist nur der Transversalmuskulatur am nächsten in kleine, nur aus wenigen Fasern bestehende Bündel vereinigt. Die Transversalmuskulatur ist stark entwickelt. Die Dorsoventralmuskeln bestehen aus feinen, mit Myoblasten versehenen Fasern. Zwischen den Längsmuskeln fanden sich zahlreiche große, multipolären Ganglienzellen ähnliche Gebilde. Kalkkörperchen sind selten.

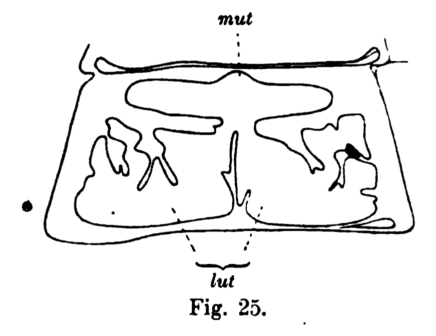


Fig. 25.

Das Wassergefäßsystem besteht aus zwei Längsgefäßen, von welchen das ventrale am Hinterrande der Proglottis ein Verbindungsgefäß besitzt, während das dorsale dessen entbehrt und übrigens im Vergleiche zu ersterem sehr eng und starkwandig ist.

Vom Nervensystem habe ich nur die beiden außerhalb der Exkretionsorgane verlaufenden Längsnerven gesehen.

Die Geschlechtsorgane münden unregelmäßig abwechselnd seitlich in eine wenig tiefe Genitalkloake aus.

Der männliche Geschlechtsapparat besteht aus einem mächtigen Cirrusbeutel (Länge 0,26 mm), welcher von starker, nicht deutlich in Längs- und Ringfasern geschiedener Muskulatur umhüllt wird; dieselbe wird am inneren Ende des Muskelsackes plötzlich sehr schwach (siehe Fig. 23). Im Cirrusbeutel liegt ein kurzer Cirrus, der, bevor er als Vas deferens aus demselben austritt, von einem ungemein starken sphärischen Sphinkter umgeben wird. An der Penistasche befestigen sich 3 starke Retraktoren, von welchen der eine dorsal, der andere ventral zur Parenchymmuskulatur verläuft, während der dritte, horizontal verlaufend, im Parenchym sich verliert. Das weite Vas deferens verläuft dorsal zu den zahlreichen Hoden. Die Vasa efferentia bilden ein reich anastomosiertes Netz von zum Teil weiten Kanälen.

Die Zahl der Hoden beträgt ca. 160; sie erfüllen in mehreren Lagen den von den weiblichen Geschlechtsorganen nicht beanspruchten Raum, der auf der der Geschlechtsöffnung entgegengesetzten Seite liegt. Auf Querschnitten oval zeigen sie einen Höhendurchmesser von 0,12 mm und einen Querdurchmesser von 0,08 mm.

Die weiblichen Geschlechtsorgane bestehen aus dem der Ausmündungsöffnung etwas genäherten Keimstocke und Dotterstocke. Bei einer Breite der Proglottis von 3,6 mm und einer Länge von nur 0,17 mm zeigt der Keimstock sich als ein 1,1 mm breites, tiefgelapptes, zweiflügeliges Organ, hinter welchem der 0,04 mm breite, fast ungelappte Dotterstock liegt.

Der Verlauf und die Art der Vereinigung, des Oviduktes, des Dotterganges und des Uterinkanales, sowie die Lage der 0,14 mm im Durchmesser messenden Schalendrüse stellen besser als jede Beschreibung die beigegebene Figur dar. Der Ovidukt besitzt einen schwachen Ookapt. Die Vagina mündet ziemlich nahe dem Ovarium in den Keimgang, so daß derselbe relativ kurz ist. Nicht weit von der Vereinigungsstelle der Vagina erweitert sich letztere zu einem großen Receptaculum seminis, das immer zahlreiche Eier enthält. Auf der dorsalen Seite dieses Samenreservoirs entspringt dann der zur Genitalkloake verlaufende Teil der Vagina. An ihrer Ursprungsstelle aus der Samenblase scheint ein kleiner Sphinkter zu liegen, der das Rückfließen des Spermas verhindert. Anschließend an das oben erwähnte Receptaculum seminis bildet sich ein zweites kleines spindelförmiges, von welchem aus dann die starkwandige Vagina fast geradlinig zum Rande verläuft. Bevor sie in die Genitalkloake mündet, ist sie noch von einem mächtigen Sphinkter umgeben. Die Genitalkloake ist, wie schon bemerkt wurde, sehr klein und wenig tief. Was nun die Lagebeziehungen des männlichen und weiblichen Geschlechtsganges zu den Wassergefäßstämmen und dem Längsnerven anbetrifft, so finden wir, daß erstere zwischen den Längsgefäßen und über dem Längsnerven durch zur Genitalkloake verlaufen. Während also die Anatomie sehr an die der Bertien der Säugetiere erinnert, ist der Verlauf von Vas deferens und Vagina in Bezug auf das Wassergefäßsystem ein anderer.

Der Uterus scheint anfangs aus 3 Teilen, die untereinander durch enge Kanäle verbunden sind, zu bestehen. Der eine Teil liegt median und vor dem Ovarium, die beiden anderen seitlich von den weiblichen Geschlechtsdrüsen (siehe Fig. 24). Er ist auf diesem Stadium von einem deutlichen Zellbelag ausgelegt.

Wenn aber der Uterus ganz von Eiern erfüllt ist und die Geschlechtsdrüsen verschwunden, nähern sich die drei Uterussäcke; doch bleibt die Dreiteilung, wie aus Fig. 25 ersichtlich, auch in den reifen Proglottiden, wenn auch weniger deutlich sichtbar, bestehen.

Die Eier sind von 3 Hüllen umgeben. Die äußere und innere sind ziemlich dickwandig, während die mittlere schwer sichtbar ist. Die Eihüllen sind durch die Reagentien stark, aber gleichmäßig kontrahiert, so daß sie von ovaler Form erscheinen. Die beiden Hauptdurchmesser für die innere Schale und den Embryo sind 0,023 und 0,01 mm. Die äußere Schale mißt 0,05 und 0,018—0,025 mm.

Ich enthalte mich einstweilen, diese Art in ein bestimmtes Genus zu stellen, da sie in keines der bis jetzt bestehenden Genera der Anoplocephaliden ganz paßt.

Der gegenwärtige Stand der Lehre von den Cytolysinen und die cytolytische Theorie der Immunität.

[Aus der Abteilung für allgemeine Pathologie des Kaiserlichen Institutes für experimentelle Medizin in St. Petersburg.]

Von **E. S. London.**

(Schluß.)

Wenden wir uns nun zu den Leukolysinen.

Die Leukolysine werden nach der allgemeinen Regel erhalten, indem man ein Tier, z. B. ein Kaninchen, mit Leukocyten einer anderen Tierart, z. B. aus dem Exsudate eines Hundes nach Injektion von Kleber, immunisiert. Wir besitzen kein Verfahren, um die einzelnen Arten von Leukocyten in reiner Form zu isolieren. Und wenn wir auch ein solches Verfahren besäßen, so würde es dennoch wohl kaum gelingen, an einem Tiere die Bildung von solchem Leukolysin hervorzurufen, welches für eine bestimmte Sorte von Leukocyten spezifisch wäre. Die in der Litteratur vorhandenen Daten gestatten uns, dieses mit voller Ueberzeugung zu behaupten. Wenn nämlich die Forscher mit einem Exsudat, in welchem eine Art von Leukocyten stark prävalierte, Tiere immunisierten, so erhielten sie ein Serum, das alle Arten von Leukocyten schonungslos vernichtete.

Man hat übrigens gar den Versuch gemacht, das leukolytische Serum zur Heilung und zur Vorbeugung des Alters zu verwenden, in der Voraussetzung, daß dasselbe durch gewisse Leukocyten, die Makrophagen, hervorgerufen werde. Die Versuche wurden aber von dem gewünschten Erfolge nicht gekrönt. Man erklärte diesen Mißerfolg dadurch, daß das leukolytische Serum nicht nur auf die Makrophagen, die Ursache des Alterns, sondern auch auf die übrigen Leukocytenarten, deren Zerstörung für den zu verjüngenden Organismus nicht ohne Schaden bleiben kann, seine deletäre Wirkung ausübt. Es unterliegt gewiß keinem Zweifel, daß der genannte Umstand einen Grund der Mißerfolge bei der Heilung des Alters mit Leukolysin abgeben muß. Daß aber das der einzige Grund der Mißerfolge sei, daran dürfen wir noch zweifeln, denn es ist noch durchaus nicht bewiesen, daß die Altersschwäche durch die Makrophagen verursacht wird.

Unter den übrigen Cytolysinen wollen wir vor allem die Tricholysine nennen, welche sich im Tiere bilden, wenn man in dessen Peritonealhöhle oder unter dessen Haut Flimmerepithel einer anderen Tierart hineinbringt. Das Serum des so behandelten Tieres gewinnt die Fähigkeit, die Bewegung der Cilien an den entsprechenden Flimmerzellen zum Stillstand zu bringen. Das ist vor der Hand Alles, was wir von den Tricholysinen wissen.

Etwas genauer sind die Nephrolysine erforscht.

Immunisiert man ein Kaninchen mit einer Emulsion von zerriebener Hundeniere, so tritt im Blute desselben Nephrolysin auf, welches beim Hunde unverkennbare Zeichen von Nephritis hervorruft. Dieses ist Heteronephrolysin. Auch Isonephrolysin läßt sich leicht herstellen. Dazu braucht man nur einem Hunde die Nierenarterie zu unterbinden. Das Serum dieses Hundes löst, sobald es einem anderen gesunden Hunde injiziert wird, Störungen der Harnsekretion aus. Einen ähnlichen Erfolg hat die Unterbindung der Ureteren, wie man aus Kaninchenversuchen ersehen konnte. Auf Grund dieser Thatsachen wurde die Vermutung ausgesprochen, die Nephrolysine spielten die hervorragendste Rolle bei der Entwickelung urämischer Anfälle. Ob dem so ist, das werden vielleicht künftige Untersuchungen zeigen.

Mit den Nephrolysinen nicht zu verwechseln sind die Supranephrolysine. Dieselben sind von Enten erhalten worden, welchen man eine Emulsion aus der Nebenniere von Meerschweinchen unter die Haut brachte. Das Serum einer solchen Ente erwirbt für das normale Meerschweinchen eine große Giftigkeit; es tötet dasselbe bisweilen innerhalb weniger Stunden.

Eine noch größere Giftigkeit zeigen die Hepatolysine, welche Kaninchen, oder besser Enten, nach Immunisierung mit einer Emulsion aus Hundeleber entwickeln. Injiziert man einem gesunden Hunde hepatolytisches Serum in einer Dosis von 2—4 ccm pro Kilogramm Körpergewicht, so kann der Tod binnen 15—20 Minuten eintreten, begleitet von Krankheitserscheinungen seitens der Leber (Herabsetzung der Harnstoffmenge, Auftreten von Leucin, Tyrosin u. dergl.).

Die Immunisierung eines Kaninchens mit einer Emulsion aus der Bauchspeicheldrüse eines Hundes veranlaßt dasselbe, wie auch zu erwarten stand, zur Bildung von Pankreatolysin, welches sich in vitro durch Aufhebung der tryptischen Wirkung des Bauchspeichels eines Hundes kenntlich macht und in vivo eine ganze Reihe von Störungen hervorruft, die einen tödlichen Ausgang nehmen können.

Injiziert man einer Katze intraperitoneal eine Emulsion aus der Schilddrüse eines Hundes, so ruft nach den neuesten Erfahrungen das Serum dieser Katze, sobald es einem Hunde eingespritzt wird, bei demselben einen Symptomkomplex hervor, welcher an die Fälle von Exstirpation der Schilddrüse erinnert.

Es erübrigt nur noch, von dem Neurolysin zu reden.

Das Schlangengift ist das Beispiel eines physiologischen Neurolysins. Künstliches Neurolysin kann man nach der gewöhnlichen Schablone erhalten: Einem Tiere von einer Art, z. B. einem Kaninchen, injiziert man subkutan eine Emulsion aus der Hirnsubstanz, einerlei, ob aus dem großen, dem kleinen Hirn oder dem Rückenmarke eines Tieres einer anderen Art, z. B. eines Hundes. Daß das auf diese Weise erhältliche Neurolysin für die Tierart, welche die Hirnsubstanz geliefert hatte, streng spezifisch ist, kann als vollkommen sicher bewiesen angesehen werden. Das Neurolysin zeichnet sich durch besondere Giftigkeit aus.

Wird dasselbe dem Organismus des betreffenden Tieres einverleibt, so bewirkt es, wie der Autor dieser Versuche sich ausdrückt, einen blitzartigen Tod.

Das ist Alles, was sich über die verschiedenen Gattungen von Cytolysinen sagen läßt. Die Carcinomolysine glauben wir mit Stillschweigen übergehen zu dürfen, da dieselben noch nicht über die Bedeutung eines Pium desiderium hinausgekommen sind.

Wir wollen nun zu den Anticytolysinen übergehen:

IV. Die Anticytolysine.

Als Anticytolysine bezeichnen wir, wie schon der Name ausdrückt, diejenigen Stoffe, welche die Wirkung der Cytolysine aufheben.

Es wird behauptet, daß jedes Tier, zu welcher zoologischen Art dasselbe auch gehören mag, sowie jeder Mensch unter normalen Verhältnissen in seinem Blute, genauer in seinem Serum, ein spezifisches Antihämolysin für seine eigenen roten Blutkörperchen besitzt.

Diese Thatsache wird durch folgenden Versuch veranschaulicht:

Von zwei Reagenzgläsern beschicken wir das eine mit Serum eines normalen Kaninchens, das andere mit der gleichen Menge physiologischer Kochsalzlösung. In das eine wie in das andere bringen wir je 2 Tropfen eines Serums, welches ein die roten Blutkörperchen von Kaninchen zerstörendes künstliches Hämolysin enthält. Wir schwenken um und lassen es eine Minute lang stehen. Dann bringen wir in beide Gläser je 1 ccm roter Blutkörperchen eines Kaninchens. Ist der von uns aufgestellte Satz richtig, laut dessen, auf den vorliegenden speziellen Fall übertragen, das Kaninchenserum die roten Blutkörperchen des Kaninchens vor der zerstörenden Wirkung des spezifisch gegen sie gerichteten Hämolysins schützt, so muß das Schicksal der roten Blutzellen in den beiden Reagenzgläsern ein verschiedenes sein. In demjenigen Glase, welches das mutmaßliche Antihämolysin enthält, müssen die Blutkörperchen unversehrt bleiben, im anderen Glase dagegen, in welchem das mutmaßliche Antihämolysin fehlt, müssen die Zellen in Lösung gehen.

So geschieht es auch in der That.

Man unterscheidet 2 Arten von Antihämolysinen, die physiologischen und die künstlichen.

Das physiologische Antihämolysin, welches sich bei diesem oder jenem Tiere oder auch beim Menschen vorfindet, besitzt die Fähigkeit, die Erythrocyten desselben Tieres oder Menschen vor der Wirkung eines heterogenen Serums zu schützen. Dieser Schutz besteht nicht etwa darin, daß die Erythrocyten unter dem Einflusse des Antihämolysins eine größere Widerstandsfähigkeit den betreffenden Hämolysinen gegenüber erwürben, sondern darin, daß die Hämolysine selbst ihre Kraft einbüßen. In einigen Fällen kommt dieses dadurch zustande, daß das Alexin des Hämolysins durch die Einwirkung des Antihämolysins unwirksam gemacht wird, in anderen Fällen bleibt das Alexin unberührt, während das Desmon seine Wirksamkeit verliert. Mithin spielen einige Antihämolysine die Rolle von Antialexinen, andere diejenige von Antidesmonen. Die bisher erforschten physiologischen Antihämolysine haben sich als Antidesmone erwiesen; doch liegt kein Grund zu der Annahme vor, daß sich unter denselben nicht auch Antialexine werden finden lassen. Wenigstens sind unter den künstlichen Anticytolysinen sowohl die einen als die anderen entdeckt worden.

Bezüglich der physiologischen Antihämolysine müssen wir noch zwei Dinge bemerken:

1) Im Serum verschiedener Tiere hat man die Anwesenheit von Antihämolysinen nachgewiesen, welche befähigt sind, Erythrocyten heterogenen Blutes zu schützen. Es handelt sich hier wiederum nicht um eine Verleihung erhöhter Widerstandsfähigkeit, sondern um Entkräftung der betreffenden Hämolysine.

2) Normales Serum kann imstande sein, die hämolytische Fähigkeit gewisser bakterieller Toxine aufzuheben, wie es z. B. bezüglich des menschlichen Serums und des Staphylotoxins nachgewiesen ist.

Wenden wir uns den künstlichen Anticytolysinen zu, so müssen wir bemerken, daß wir vor der Hand nur Angaben über die am meisten erforschten Antihämolysine, die relativ weniger studierten Antispermolysine und die ganz wenig bekannten Antihepatolysine vorfinden.

Die künstliche Reproduktion der Anticytolysine begründet sich auf den allgemeinen Regeln. Wollen wir an einem bestimmten Tiere die Bildung eines bestimmten Anticytolysins hervorrufen, so injizieren wir demselben das betreffende Cytolysin. Der Organismus reagiert auf die Cytolysineinspritzung durch Produktion eines Stoffes, welcher die Wirkung desselben aufhebt durch Neutralisierung entweder des Alexins oder des Desmons, wie es übrigens bereits oben geschildert worden ist. Man hat übrigens behauptet, künstliches Antialexin könne bei einem Tiere durch Injektion von Bakterien hervorgerufen werden. Dieser Angabe gemäß gewinnt das Serum eines solchen Tieres die Fähigkeit, die Aktivität eines Hämolysins durch Neutralität seines Alexins aufzuheben. Diese Behauptung wird indessen stark bestritten.

Es ist noch unbekannt, ob die Anticytolysine einfache, einheitliche Stoffe oder, nach Art der Cytolysine, zusammengesetzte Körper sind. Wenigstens verändert eine Erwärmung, sogar bis 68° C, die Wirksamkeit derselben nicht. Danach zu urteilen, daß die Wirkung einiger Anticytolysine sich gegen das Alexin, anderer Anticytolysine gegen das Desmon richtet, muß wohl angenommen werden, daß die Anticytolysine überhaupt von zweierlei Art sind, deren eine dem einen und deren andere dem anderen der Cytolysinelemente entspricht. Auf welche Weise das Antialexin und das Antidesmon im Organismus wirken, ist schwer zu sagen. Es sind z. B. Beobachtungen vorhanden, welche beweisen, daß Antihämoalexin, wenn dasselbe gleichzeitig mit dem entsprechenden künstlichen Hämodesmon dem Organismus einverleibt wird, die giftige Wirkung des Hämodesmon aufhebt. Diese aufhebende Wirkung meint der Autor nicht durch Neutralisation des Alexins erklären zu dürfen, da das letztere sich als kaum geschwächt erweist.

Die Frage, ob die physiologischen Anticytolysine spezifisch sind, hat noch keine genügende Beurteilung gefunden. Was aber die künstlichen Anticytolysine betrifft, so ist deren spezifischer Charakter mit voller Unzweideutigkeit bewiesen worden, so daß sogar die Möglichkeit anerkannt wird, dieselben als Reagentien zum Nachweis der spezifischen Alexine und Desmone zu verwenden. Die Frage, in welcher Weise der Organismus auf Injektionen von Anticytolysin reagiert, ist noch nicht behandelt worden, und es ließe sich schwer a priori angeben, zu was für Resultaten diesbezügliche Versuche führen könnten. Hinsichtlich des Diphtherieantitoxins ist bekannt, daß dasselbe nicht die Bildung einer weiteren Antisubstanz hervorruft.

Fügen wir zu dem Gesagten noch hinzu, daß in einem Organismus, der den betreffenden Injektionen unterworfen wird, gleichzeitig und ohne einander zu behindern, die Bildung eines Cytolysins und irgend eines anderen dasselbe nicht neutralisierenden Anticytolysins vor sich gehen

kann, so müssen wir unsere Aufgabe in ihrem ersten Teile als erfüllt ansehen: Wir haben in möglichst kurzer und systematischer Form alle diejenigen thatsächlichen Daten vorgeführt, aus denen die gegenwärtige Lehre von den Cytolysinen sich zusammensetzt.

V. Die cytolytische Theorie der Immunität.

Die Lehre von den Cytolysinen bietet außer ihrem unmittelbaren Interesse auch noch ein indirektes. Die erbrachten Daten über die Cytolysine gestatten, einige Hypothesen aufzustellen, die in verschiedene Gebiete der normalen Biologie und der Pathologie fallen. Es würde uns jedoch zu weit führen, wollten wir auch nur in allgemeinen Umrissen alle diese Hypothesen zu schildern suchen. Wir wollen uns daher darauf beschränken, die neue Theorie der Immunität anzuführen, wie sie sich auf dem Boden der heutigen Lehre von den Cytolysinen aufbauen läßt.

Der normale tierische und menschliche Organismus ist zum Kampfe von der Natur mit dreierlei Waffen mehr oder weniger reich begabt: mit Waffen zum Angriffe, zur Zerstörung und zur Abwehr.

Als Waffen zum Angriffe dienen die Desmone. Ihre Bestimmung besteht darin, daß sie gleichsam die Attacke auf die Zellelemente eröffnen, welche der Organismus zur Vernichtung ins Auge gefaßt hat. In einem Teile der Fälle handelt es sich um dem Organismus fremde Zellelemente, welche von außen her auf irgend eine Weise in denselben eingedrungen sind (Hetero- und Isodesmone), in anderen Fällen unterliegen der Fortschaffung Zellelemente, welche dem Organismus selbst angehört hatten, aber aus diesem oder jenem Grunde ihrer Zugehörigkeit zu demselben verlustig gingen (Autodesmone in der Art des Autospermodesmon).

Das Desmon ist bloß befähigt, das der Beseitigung unterliegende Zellelement anzugreifen; es ist jedoch nicht imstande, dasselbe zu zerstören. Der Angriff besteht darin, daß das Desmon sich mit dem Zellelement verbindet, um es dem Alexin zur Vernichtung zu übergeben. Das Alexin, welches für sich allein den Zellelementen gegenüber sich indifferent verhält, tritt hier gegen dieselben als Zerstörungswaffe auf, sobald das betreffende Desmon sie verwundbar gemacht hat. Einige Forscher äußern die Ansicht, daß alle Desmone, in vivo wie in vitro, eine excitierende Wirkung auf die Leukocyten ausüben, wodurch sie dieselben zur Zerstörung der schädlichen Zellelemente veranlassen; ein Autor erklärt diese Wirkung durch die Affinität, welche zwischen dem Desmon und dem in den Leukocyten enthaltenen Alexin besteht.

Auf diese Weise vermag der Organismus, dank seinem Vorrate an Cytolysinelementen, sich der für ihn unliebsamen Zellelemente zu entledigen. Außerdem verfügt der Organismus übrigens noch über besondere Stoffe, welche unter dem Namen der Agglutinine bekannt sind. Die Agglutinine kommen aller Wahrscheinlichkeit den Cytodesmonen sehr nahe, obwohl das nähere Verhältnis zwischen denselben noch nicht festgestellt ist.

Die fremden Zellelemente sind aber dem Organismus nicht nur durch ihre bloße Gegenwart gefährlich, sondern auch durch jene Lysine, oder, wie man sie noch zu nennen pflegt, Toxine, welche sich aus den Zellelementen auf diese oder jene Weise bilden.

Gegen diese Gifte schützt sich der Organismus vermittelst der Antilysine (Antitoxine). Hierher gehören noch die wenig erforschten Präcipitine. Alles das sind Schutzwaffen. Daß der normale Organismus über

derartige Waffen verfügt, wird durch den direkten Versuch bewiesen. So entdeckt man beim normalen Pferde die Anwesenheit von Diphtherieantitoxin, so fand man beim normalen Menschen Antistaphylotoxin, bei normalen Schweinen Anticrotin u. s. w. Da mehrere Forscher den Lysinen einen fermentativen Charakter zusprechen, dürfte es wohl gestattet sein, auch die typischen Antifermente, wie z. B. die in normalen Organismen aufgefundenen Stoffe, Antilab, Antithrombase, Anticynarase u. s. w., zu den Antilysinen zu rechnen.

Mit einem Worte, die natürliche Immunität wird durch drei Gruppen von Stoffen gesichert, die Desmone, die Alexine und die Antilysine.

Der Grad der Immunität hängt von der Quantität und der Qualität ab, in welcher die genannten Gruppen im Organismus enthalten sind.

Die Quantität des enthaltenen Körpers ist deshalb von Wichtigkeit, weil die Schutzstoffe nicht nach der Art der Enzyme durch ihre bloße Anwesenheit wirken. Dieselben nehmen vielmehr am Kampfe unmittelbaren Anteil und reiben sich proportional der Hitze des Kampfes auf. Dieses wird durch direkte Versuche bewiesen. Bestimmt man z. B. an einem Kaninchen die hämolytische Fähigkeit seines Plasmas resp. Serums gegen Erythrocyten von Ziegen und spritzt man sodann diesem Kaninchen eine bestimmte Menge solcher Erythrocyten ein, so erweist sich nach einer Viertelstunden die in Rede stehende hämolytische Fähigkeit bei demselben als herabgesetzt. Die Wiederherstellung dieser Fähigkeit beginnt erst nach 2—4 Stunden. Es ist klar, daß ein Teil des vorhandenen Vorrates an betreffendem Hämolysin, über welchen das Versuchstier verfügte, für die Zerstörung der heterogenen Erythrocyten verausgabt worden war. Man erhält dasselbe, was sich im Reagenzglase findet.

Was nun das qualitative Verhalten betrifft, so wird dasselbe durch den spezifischen Charakter der Schutzmittel bestimmt. Wir haben gesehen, daß es verschiedene Lysine und Antilysine giebt. Es ist notwendig, daß sowohl das Desmon als auch das Alexin und das Antilysin in spezifischer Weise denjenigen Zellelementen oder Giften angepaßt seien, welche beseitigt werden sollen. Auch die Kompliziertheit der Zusammensetzung der Lysine ist hier von Bedeutung. Es kann z. B. vorkommen, daß das im gegebenen Falle nötige Desmon zu Gebote steht, das nötige Alexin aber fehlt. Fälle entgegengesetzter Art sind nicht weniger bekannt.

Der Grad der natürlichen Immunität wird also bestimmt durch die quantitativen und qualitativen Verhältnisse der vorrätig vorhandenen Desmone, Alexine und Antilysine.

Gehen wir nun zur künstlichen Immunität über.

Die Kraft der künstlichen Immunität begründet sich auf denselben Faktoren, wie die der natürlichen. Die Stützen der künstlichen Immunität sind ebenfalls die Desmone, die Alexine und die Antilysine.

Jede Gruppe der genannten Stoffe wird auf besondere Art reproduziert.

Um die Bildung von Desmonen hervorzurufen, muß man das Versuchsobjekt mit der betreffenden Art von Zellelementen immunisieren. Das hierbei neugebildete Desmon ist jedoch nicht eine Wiederholung des analogen physiologischen Desmon. Die Wirkungsweise derselben ist zwar die gleiche, ihr Verhalten gegen Temperaturen, Säuren und Alkalien ist das nämliche, in anderen Beziehungen jedoch unterscheiden sie sich voneinander. Das künstliche Desmon erinnert in seinen Haupt-

zügen an das physiologische, ist aber mit demselben nicht identisch. — Ich will zugleich bemerken, daß der Organismus auch die künstlichen Desmone mit großer Leichtigkeit produziert, sogar im vollständigen Hungerzustande. Bemerkenswert ist ferner, daß der hungernde Organismus das einmal gebildete Desmon standhaft festhält. Schließlich sei erwähnt, daß der Organismus bei entsprechender Immunisierung gleichzeitig verschiedenartige Desmone entwickelt. Mit anderen Worten, der Organismus setzt einer komplizierten Einwirkung eine komplizierte und stets zweckentsprechende Reaktion entgegen, was in den Fällen von Mischinfektionen von großer Wichtigkeit ist.

Das Alexin wird nicht durch Immunisierung ins Leben gerufen. Das bei der Immunisierung neugebildete Desmon begnügt sich zur Bildung heilen Cytolysins mit den physiologischen Vorräten des entsprechenden Alexins. Wenn daher das letztere fehlt, so bleibt das Desmon alleinstehend und das Endziel der Immunisierung wird nicht erreicht. Zwar ist darauf hingewiesen worden, daß Bouilloneinspritzungen zur Erhöhung des Alexingehaltes führen, doch werden erst weitere Forschungen aufklären können, wie weit dieses Mittel die Immunisierung ihrem Hauptziele nahezubringen vermag.

Die künstlichen Antilysine (Antitoxine) werden vom Organismus als Erwiderung auf eine Einspritzung der betreffenden Lysine (Toxine) entwickelt. Der Erfolg der Immunisierung in dieser Richtung ist ebenfalls nicht immer ein voller und hängt von verschiedenen Umständen ab, hauptsächlich von solchen individueller Natur.

Die Bildung aller genannten Mittel zur natürlichen wie auch zur künstlichen Immunität steht unstreitig mit der Lebensthätigkeit verschiedener Zellgruppen des Organismus in engster Verbindung. Das tiefe Geheimnis dieser Verbindung an den Tag zu bringen, ist die Aufgabe der künftigen Forschungen auf dem genannten Gebiete.

Dieses ist das Bild, welches der Mechanismus der Immunität im Lichte der neuesten Untersuchungen uns heute darbietet. In diesem Bilde erscheinen jene verschiedenartigen Elemente, welche früher den beiden hauptsächlichsten Theorieen der Immunität, der phagocytären und der humoralen, zu Grunde gelegt worden waren, in harmonischen Einklang gebracht. Die phagocytäre Theorie hat in der letzten Zeit einen Teil ihrer früheren Giltigkeit verloren. Dennoch wird wohl niemand derselben das große Verdienst absprechen wollen, der Thätigkeit der Zelle in der Lehre von der Immunität den hervorragenden Platz angewiesen zu haben. Zieht man die neuesten Daten in Betracht, so kann man sagen, daß die phagocytäre Theorie gegenwärtig zu einer cytären umbenannt werden müßte. Die Zellen des Organismus sind als jene lebendigen, mikroskopisch kleinen Laboratorien anzusehen, in denen die Immunitätsmittel hergestellt werden. Es ist ferner nicht unwahrscheinlich, daß der Einzelkampf des Organismus mit den schädlichen Elementen sich gerade im Bereiche dieser Laboratorien abspielt. Andererseits aber läßt es sich nicht leugnen, daß der Kampf auch außerhalb des Gebietes der Zellen vor sich geht. Mit anderen Worten, sowohl im Bereiche der Zellen selbst als auch innerhalb der intercellulären Substanzen wird der Kampf gegen die heterogenen Zellen und deren Produkte geführt. Beide Theorieen, die phagocytäre und die humorale, fließen auf diese Weise zu einer Theorie zusammen, welche mit voller Berechtigung die cytolytische genannt werden kann. Denn dieser Name schließt sowohl einen Hinweis auf die Beteiligung der Zellen (cyto-),

als auch einen solchen auf die zerstörenden Eigenschaften der intercellulären Substanzen (-lytisch), im weiten Sinne des Wortes aufgefaßt, in sich.

Bibliographie.

1) Arthus, Maurice et Vanteenbergue, Paul, Un procédé de l'obtention et de conservation d'un sérum précipitant le sérum de sang humain. (Compt. rend. des séances de la Société de Biolog. T. LIV. 1902. No. 8. p. 251.)
2) Ascoli, M., Isoagglutinine und Isolysine menschlicher Blutsera. (Münch. med. Wochenschr. 1901. No. 31. p. 1239.)
3) — —, Isoagglutinine ed isolisine dei sieri sangue umani. (La clinica Italiana. 1901. No. 1. Nota I.)
4) Bandalin, J. G., Der Kampf der Wissenschaft mit dem Alter. (Wratschebnaja Gazetta. 1901. No. 36 u. 37. p. 170.) [Russisch.]
5) — —, Ueber die natürlichen Antihämolysine. (Wratschebnaja Gazetta. 1902. No. 2. p. 25.) [Russisch.]
6) Bard, Du diagnostic par l'hématolyse de la nature cancéreuse des pleurésies des péritonites hémorrhagiques. (La presse médicale. 1901. No. 31. p. 76.)
7) Baumgarten, P., Die Hämolyse (Ehrlich) vom Gesichtspunkte osmotischer Störungen betrachtet; chemische und medizinische Untersuchungen. (Festschrift für M. Jaffe. Braunschweig 1901. p. 277.)
8) — —, Mikroskopische Untersuchungen über Hämolysine im heterogenen Serum. (Berl. klin. Wochenschr. 1901. No. 50. p. 1241.)
9) Belfanti e Carbone, Produzione di sostance tossiche nel siero di animali inoculati con sangue eterogeneo. (Giornale della R. Accad. di med. di Torino. 1898. No. 8. p. 321.)
10) Besredka, Les antihémolysines naturelles. (Annales de l'Institut Pasteur. T. XV. 1901. No. 10. p. 785.)
11) — —, De l'hémolysine streptococcique. (Annales de l'Institut Pasteur. T. XV. 1901. No. 12. p. 880.)
12) Bier, August, Die Transfusion von Blut, insbesondere von fremdartigem Blut und ihre Verwendbarkeit zu Heilzwecken von neuen Gesichtspunkten betrachtet. (Münch. med. Wochenschr. 1901. No. 15. p. 570.)
13) Bierry, Recherches sur les injections de sang et de sérum cytotoxique au chien. (Compt. rend. des séances de la Société de Biolog. T. LIII. 1901. No. 28. p. 839.)
14) —, Recherches sur les injections de sang et de sérum nephrotoxiques au chien. (Compt. rend. des séances de l'Académie des sciences. 1901. 6 mai.)
15) Bigart et Bernard, Léon, Sérum surrénotoxique. (Compt. rend. des séances de la Société de Biolog. T. LIII. 1901. No. 7. p. 161. Vgl. auch La presse médicale. 1901. No. 15. p. 76.)
16) Bordet, Jules, Sur l'agglutination et la dissolution des globules rouges par le sérum d'animaux injectés de sang défibriné. (Annales de l'Institut Pasteur. 1898. T. XII. p. 688.)
17) — —, Les sérums hémolytiques, leurs antitoxines et les théories des sérums cytolytiques. (Annales de l'Institut Pasteur. 1900. No. 5. p. 257.)
18) Bordet, Jules, Sérum cytolytiques. (Annales de l'Institut Pasteur. T. XVI. 1901. p. 303.)
19) — — et Gengou, Substances sensibilisatrices dans les sérums. (Annales de l'Institut Pasteur. T. XV. 1901. p. 289.)
20) Briot, A., Sur le mode d'action du sérum sanguin sur la pepsine. (Compt. rend. des séances de la Société de Biolog. T. LIV. 1902. No. 4. p. 140.)
21) Brouha, Sur les propriétés du sérum des cancereux au point de vue des anticorps des levures. (Centralbl. f. Bakt. etc. I. Abt. Bd. XXX. 1901. No. 25. p. 945.)
22) Buchner, M., Weitere Untersuchungen über die bakterienfeindlichen und globuliciden Wirkungen des Blutserums. (Arch. f. Hyg. Bd. XVII. 1893. p. 112.)
23) — —, Immunität. (Münch. med. Wochenschr. 1900. No. 3. p. 1093.)
24) — —, Zur Kenntnis der Alexine sowie der spezifisch-baktericiden und spezifisch-hämolytischen Wirkungen. (Münch. med. Wochenschr. 1900. No. 9. p. 277.)
25) Buchner, H., Sind die Alexine einfache oder komplexe Körper? (Berl. klin. Wochenschr. 1901. No. 33.)
26) — — und Geret, L., Ueber ein kristallinisches Immunisierungsprodukt; II. Mitteilung. (Münch. med. Wochenschr. 1901. No. 32. p. 1275.)
27) Bulloch, W., Ueber die Beziehungen zwischen Hämolysin und Bakteriolysis. (Centralbl. f. Bakt. etc. I. Abt. Bd. XXIX. 1901. p. 724.)

28) Bulloch, William, Ueber die Uebertragung von Hämolysinen von den Eltern auf die Nachkommen. Bericht über die Verhandlungen in der Versammlung der bakteriologischen Abteilung der pathologischen Gesellschaft von London am 21. Januar 1902. (Centralbl. f. Bakt. etc. I. Abt. Referate. Bd. XXXI. 1902. p. 178.)
29) — — und Hunter, W., Ueber Pyocyanolysin, eine hämolytische Substanz in Kulturen des Bact. pyocyaneum. (Centralbl. f. Bakt. etc. I. Abt. Bd. XXVIII. 1900. No. 25. p. 865.)
30) Butza, J., Un nouveau moyen pratique pour distinguer le sang de l'homme d'avec celui des animant. (Compt. rend. des séances de la Société de Biolog. T. LIV. No. 12. p. 406.)
31) Camus, J., Action anticoagulante des injections intraveineuses de lait d'une espèce animale sur le sang des animaux de même espèce. (Compt. rend. des séances de l'Académie des sciences. T. CXXXI. 1900. No. 27. p. 1309.)
32) — —, Recherches sur la fibrinolyse. (Compt. rend. des séances de l'Académie des sciences. 1901. No. 4. p. 215.)
33) Camus, J., et Pagniez, P., D'un pouvoir agglutinant de quelques sérums humains vis-à-vis des hématies de l'homme. (La presse médicale. 1901. No. 19. p. 97.)
34) Camus, J. et Pagnier, P., Au sujet d'une sensibilisatrice dans le sérum des tuberculeux. (Compt. rend. des séances de la Société de Biolog. T. LIII. 1901. No. 25. p. 734.)
35) — —, Variabilité de l'alexine dans les sérums pathologiques; existence d'une substance antihémolysante dans le sérum humain. (Compt. rend. des séances de la Société de Biolog. T. LIII. 1901. No. 25. p. 730.)
36) Carré et Vallée, Sur les substances toxiques des sérums normaux. (Compt. rend. des séances de la Société de Biolog. T. LII. 1902. No. 6. p. 176.)
37) Cantacuzène, J., Sur les variations quantitatives et qualitatives des globules rouges, provoquées chez le lapin par les injections de sérum hémolytique. (Annales de l'Institut Pasteur. No. 6. p. 378.)
38) Celli, A., Carducci, A., Casagrandi, O., Primi tentativi di ricerca di una emolisina nella malaria. Roma 1902.
39) Charcot, J.-R., Quelques faits rélatifs à des recherches sur la sérothérapie du cancer. (Compt. rend. des séances de la Société de Biolog. T. LIV. 1902. No. 1. p. 15.)
40) Conradi, H., Ueber die Bedeutung baktericider Stoffe bei der Autolyse. (Beitr. zur chem. Physiol. u. Pathol. Bd. I. 1901. Heft 5 u. 6.)
41) Czyhlarz, Ernst v., und Donath, Julius, Experimentelle Untersuchungen zur Lehre von der Entgiftung. (Zeitschr. f. Heilkde. Bd. XXII. 1901. N. F. Bd. II. Heft 2. p. 1.)
42) Delezenne, C., Sérum néphrotoxique. (Annales de l'Institut Pasteur. 1900. No. 10. p. 686.)
43) — —, Sérum antihépatique. (La semaine médicale. 1900. No. 35. p. 6.)
44) Dieudonné, Beiträge zum biologischen Nachweis von Menschenblut. (Münch. med. Wochenschr. 1901. No. 14. p. 533.)
45) Deutsch, Ladislaw, Berichtung (telegraphisch). (Deutsche med. Wochenschr. 1901. No. 8. p. 127.)
46) Donat, J. und Landsteiner, K., Ueber antilytische Sera. (Wien. klin. Wochenschr. 1901. No. 30.)
47) von Dungern, Globulicide Wirkungen des tierischen Organismus. (Münch. med. Wochenschr. 1899. No. 13. p. 605.)
48) — —, Beiträge zur Immunitätslehre. (Ebendaselbst. 1900. No. 28. p. 962.)
49) — —, Spezifisches Immunserum gegen Epithel. (Ebendaselbst. 1899. No. 38. p. 1228.)
50) Ehrlich, P., Die Schutzstoffe des Blutes. (Deutsche med. Wochenschr. 1901. No. 50. p. 865 u. No. 52. p. 127.)
51) — — und Morgenroth, Zur Theorie der Lysinwirkung. (Berl. klin. Wochenschr. 1899. No. 1. p. 6.)
52) — —, Ueber Hämolysine. (Ebendaselbst. 1899. No. 22. p. 481. 1900. No. 21. p. 453. 1901. No. 21. p. 569 u. No. 22. p. 598.)
53) Ehrlich, P. und Sachs, H., Ueber die Vielheit der Komplemente des Serums. (Berl. klin. Wochenschr. 1902. No. 14. p. 297.)
54) Eisenberg, Philipp, Ueber Isoagglutinine und Isolysine in menschlichen Seris. (Wien. klin. Wochenschr. 1901. No. 42. p. 1020.)
55) Emmerich und Tsuboi, Ueber die Natur der Schutz- und Heilsubstanz des Blutes. (Verhandlungen des XI. Kongresses für innere Medizin zu Leipzig. 1902.)
56) Friedberger, Ueber den Uebergang von Blutkörperchen agglutinierenden Substanzen in den Urin. (Berl. klin. Wochenschr. 1900. No. 53. p. 1236.)

57) Gladin, G. P., Ueber den Einfluß der Injektionen von leukotoxischem Serum auf die Morphologie des Blutes. (Bolnitschnaja Gazeta Botkina. 1901. No. 33. p. 137. [Russisch.]
58) Gontscharukov, N., Ueber die Herstellung eines für Schilddrüse spezifischen Serums. (Centralbl. f. allgem. Pathologie u. path. Anatomie. Bd. XIII. 1902. No. 4. p. 121.)
59) Gruber, Max, Zur Theorie der Antikörper; über die Antitoxinimmunität. (Münch. med. Wochenschr. 1901. No. 47. p. 1880.)
60) Gusew, G. A., Ein Versuch der quantitativen Bestimmung der Alexine im Serum gesunder und kranker Menschen. (Russki Wratsch. 1902. No. 7. p. 249. [Russisch.]
61) Grünbaum, Albert, Note on the „blood relationship" of man and the anthropoid apes. (The Lancet. 1902.)
62) Halban, Joseph, Agglutinationsversuche mit mütterlichem und kindlichem Blute. (Wien. klin. Wochenschr. 1900. No. 24. p. 545.)
63) Halban und Landsteiner, Ueber Unterschiede des fötalen und mütterlichen Blutserums und über eine agglutinations- und füllungshemmende Wirkung des Normalserums. (Münch. med. Wochenschr. 1902. No. 12. p. 473.)
64) Hahn, M., Immunisierung und Heilversuche mit den plasmatischen Zellsäften von Bakterien. (Münch. med. Wochenschr. 1897. p. 1344.)
65) — — und Tromsdorff, Ueber Agglutinine. (Münch. med. Wochenschr. 1900. No. 13. p. 413.)
66) Hédon, E., Sur l'hémolyse par les glucosides globulicides et les conditions de milieu qui la favorisent ou l'empêchent. (Compt. rend. des séances de la Société de Biolog. 1901. p. 381.)
67) Hegeler, A., Einfluß der chemischen Reaktion auf die baktericide Serumwirkung. (Arch. f. Hyg. Bd. XL. 1901. p. 375.)
68) Jacoby, M., Ueber Ricinimmunität. Beiträge zur chemischen Physiologie und Pathologie. (Zeitschr. f. d. gesamte Biochemie. Bd. I. 1901. p. 51.)
69) Janowski, M. W., Beiträge zur Frage von der pathologischen Bedeutung der Widerstandsfähigkeit der Erythrocyten. (Iswiestja Imperatorskoj Wojenno-Medicinskoj Akademji. 1901. No. 1. p. 3.)
70) Julliard, Ch., De l'hémolyse dans les épanchements hémorragiques traumatiques des séreuses articulaires et prérotuliennes. (Compt. rend. des séances de la Société de Biolog. 1901. No. 22. p. 629.)
71) Kraus, Rudolf, und Clairmont, Paul, Ueber Bakteriohämolysine. (Wien. klin. Wochenschr. 1901. No. 42. p. 1016.)
72) Kraus, R., und Ludwig, St., Ueber Bakteriohämagglutinine und Antihämagglutinine. (Wien. klin. Wochenschr. 1902. No. 5. p. 120.)
73) Kraus, R. und Eisenberg, Ph., Ueber Immunisierung mit Immunsubstanzen. (Centralbl. f. Bakt. etc. I. Abt. Originale. Bd. XXXI. 1902. p. 208.)
74) Krükow, A., Ueber eine neue Methode zur Unterscheidung des Blutes von Menschen und Tieren. (Vortrag, gehalten in der physiologischen Abteilung der Kaiserlichen Gesellschaft von Freunden der Naturkunde, der Anthropologie und Ethnographie, den 27. November 1901.) [Russisch.]
75) Landsteiner, Karl, Zur Kenntnis der spezifisch auf Blutkörperchen wirkenden Sera. (Centralbl. f. Bakt. etc. I. Abt. Bd. XXV. 1899. p. 546.)
76) — —, Ueber Agglutinationserscheinungen normalen menschlichen Blutes. (Wien. klin. Wochenschr. 1901. No. 46.)
77) Landsteiner, Karl, und Harli, Ariano, Ueber die Hämoagglutinine normaler Sera. (Wien. klin. Wochenschr. 1902. No. 2. p. 38.)
78) de Leslie, C., Influence de la spermotoxine sur la reproduction. (Compt. rend. de séances de l'Académie des sciences. 1901. No. 15. p. 544.)
79) Lesné et Ravaut, P., Des rapports que présentent entre elles l'hémoglobinurie, la cholurie et l'urobilinurie secondaires et l'hématolyse expérimentale. (Compt. rend. des séances de la Société de Biolog. 1901. No. 39. p. 1106.)
80) Levanditi, Sur l'état de la cytase dans le plasma des animaux normaux et des organismes vaccinés contre le vibrio cholérique. (Annales de l'Institut Pasteur. T. XV. 1901. No. 12. p. 894.)
81) Levanditi, C., Mécanisme de l'anémie expérimentale produite par l'introduction d'hémolysines spécifiques. (Compt. rend. des séances de la Société de Biolog. T. LIV. 1902. No. 11. p. 375.)
82) — — L'influence de l'anticytase sur le sort des ammant qui reçoivent des hémolysines spécifiques. (Compt. rend. des séances de la Société de Biolog. T. LIV. 1902. No. 11. p. 376.)
83) Lindemann, W., Sur le mode d'action de certains poisons rénaux. (Annales de l'Institut Pasteur. 1900. No. 2. p. 49.)

84) Linoissier, G. et Lemoine, G. H., Sur les substances précipitantes des albumines (précipitines) contenues dans certains sérums spécifiques. (Compt. rend. des séances de la Société de Biolog. T. LIX. 1902. No. 3. p. 85.)
85) — —, Sur la spécificité des sérums précipitants. (Compt. rend. des séances de la Société de Biolog. T. LIV. 1902. No. 11. p. 369.)
86) Linoissier, Sur la recherche médico-légale de l'origine du sang à l'aide des sérums précipitants. (La semaine médicale. 1902. No. 13. p. 104.)
87) Linoissier et Lemoine, Utilisation des sérums précipitants pour déceler l'existence d'une albuminurie d'origine digestive. (La semaine médicale. 1902. No. 17. p. 143.)
88) Lipstein, A., Die Komplementablenkung bei baktericiden Reagenzglasversuchen und ihre Ursache. (Centralbl. f. Bakt. etc. I. Abt. Bd. XXXI. 1902. No. 10. p. 460.)
89) London, E.-S., De l'influence de certains agents pathologiques sur les propriétés bactéricides du sang; première communication: des propriétés bactéricides du sang dans les conditions normales. (Arch. des sciences biologiques, publiées par l'Institut impérial de médecine expérimentale. T. V. 1897. p. 88.)
90) — —, De l'influence de certains agents pathologiques sur les propriétés bactéricides du sang; deuxième communication: des propriétés bactéricides du sang dans l'excitation douleureuse, dans l'inanition et dans les troubles respiratoires. (Ibid. T. V. 1897. p. 197.)
91) — —, Contribution à l'étude des hémolysines; première mémoire. (Ibid. T. VIII. 1901. No. 3. p. 285.)
92) — —, Contribution à l'étude des hémolysines; deuxième mémoire. (Ibid. T. VIII. 1901. No. 4. p. 327.)
93) — —, Contribution à l'étude des spermolysines; première mémoire. (Ibid. 1902.)
94) — —, Contribution à l'étude des spermolysines; deuxième mémoire. (Ibid. 1902.)
95) Lukjanow, S. M., Reden und Skizzen. Ueber Intercellularsubstanzen. 51 pp. St. Petersburg 1899. [Russisch.]
96) Mahrt, G., Ueber den Uebergang des Typhusagglutinins von der Mutter auf das Kind. (Centralbl. f. Stoffwechsel und Verdauungskrankheiten. 1901. No. 1. p. 1.)
97) Malkoff, Beitrag zur Frage der Agglutination der roten Blutkörperchen. (Deutsche med. Wochenschr. 1900. No. 14.)
98) Mańkowski, A. Th., Zur Frage von den Zellgiften (Cytotoxinen). [Vorläufige Mitteilung.] (Russki Wratsch. 1902. No. 6. p. 215.) [Russisch.]
99) Manille, Ueber Antikörper gegen chemisch reine Eiweißstoffe. (Münch. med. Wochensch. Bd. XIX. 1901. p. 234.)
100) Markl, Ueber Hemmung der Hämolyse durch Salze. (Zeitschr. f. Hygiene und Infektionskrankheiten. Bd. XXXIX. 1902. Heft 1. p. 86.)
101) Matthes, Max, Experimenteller Beitrag zur Frage der Hämolyse. (Münch. med. Wochenschr. 1902. No. 1. p. 8.)
102) Mertens, V. E., Ein biologischer Beweis für die Herkunft des Albumins im Nephritisharn aus dem Blute. (Deutsche med. Wochenschr. 1901. No. 1. p. 161.)
103) Metalnikoff, J., Étude sur la spermotoxine. (Annales de l'Institut Pasteur. 1900. No. 9. p. 577.)
104) — —, Ueber hämolytisches Serum durch Blutfütterung. (Centralbl. f. Bakt. etc. I. Abt. Bd. XXIX. 1901. p. 531.)
105) Metschnikoff, E., Resorption des cellules. (Annales de l'Institut Pasteur. 1899. No. 10. p. 737.)
106) — —, Recherches sur l'influence de l'organisme sur les toxines; sur la spermotoxine et l'antispermotoxine; 4. mémoire. (Ibid. 1900. No. 6. p. 369.)
107) — —, L'immunité dans les maladies infectieuses. Paris 1901.
108) Miliar, De l'hémolyse dans les épanchements hémorrhagiques. (Compt. rend. des séances de la Société de Biolog. 1901. No. 8. p. 207.)
109) Moro, Ernst, Biologische Beziehungen zwischen Milch und Serum. (Wiener klin. Wochenschr. 1901. No. 44. p. 1173.)
110) Moxter, Ueber ein spezifisches Immunserum gegen Spermatozoën. (Deutsche med. Wochenschr. 1900. No. 4. p. 62.)
111) Müller, Theodor, Ueber die Antihämolysine normaler Sera. (Centralbl. f. Bakt. etc. I. Abt. Bd. XXIX. 1901. p. 175 u. 860.)
112) Neisser, M., Ueber die Vielheit der im normalen Serum vorhandenen Antikörper. (Deutsche med. Wochenschr. 1900. No. 49.)
113) Neisser, Max und Wechsberg, Ueber die Wirkungsart baktericider Sera. (Münch. med. Wochenschr. 1901. No. 18.)
114) Neisser, M. und Lubowski, R., Läßt sich durch Einspritzung von agglutinierten Typhusbacillen eine Agglutininproduktion hervorrufen? (Centralbl. f. Bakt. etc. I. Abt. Bd. XXX. 1901. No. 13.)

115) Nolf, T., Globulyse et pression osmotique. (Annales de l'Institut Pasteur. 1900. No. 6. p. 492.)
116) Nötel, Ueber ein Verfahren zum Nachweise von Pferdefleisch. (Zeitschr. f. Hygiene u. Infektionskrankh. Bd. XXXIX. 1902. Heft 3. p. 373.)
117) Nuttall, G. H. F., The new biological test for blood in relation to zoological classification. (Procedings of the Royal Society of London. Vol. XLIX. 1901. No. 453. p. 150.)
118) Ogier et Hercher, Recherches de la provenance des taches de sang. (La presse médicale. 1901. No. 35. p. 177.)
119) Pagano, G., Sur une nouvelle propriété du sang de quelques animaux. (Arch. italiennes de biologie. Vol. XXIV. 1895. p. 287.)
120) Petersson, Alfred, Ein sichtbarer Nachweis von Alexinwirkungen. (Centralbl. f. Bakt. etc. I. Abt. Bd. XXX. 1901. No. 12. p. 726.)
121) Pfeiffer, R., Ueber die immunisierende Wirkung mit Choleraamboceptoren. (Deutsche med. Wochenschr. 1901. No. 50. p. 867.)
122) Phisalix et Bertrand, L'immunité du hérisson contre la venin de vipère. (Compt. rend. des séances de la Société de Biologie. T. VI. 1895. p. 639.)
123) Pich, E., Zur Kenntnis der Immunkörper. [Dritte Mitteilung.] (Beiträge zur chemischen Physiologie und Pathologie. Bd. I. 1902. Heft 10—12. p. 445.)
124) Pohl, J., Ueber Blutimmunität. (Arch. internationales de Pharmacodynamie et de Thérapie. Vol. VIII. 1901. Fasc. 5 et 6. p. 43.)
125) Rehns, Jules, Demonstration de l'existence des hémolysines composées, spécialement des alexines à l'état libre et actif dans le sang circulant. (Compt. rend. des séances de la Société de Biologie. T. LIII. 1901. No. 12. p. 333.)
126) von Riegler, Gustav, Das Schwanken der Alkalicität des Gesamtblutes und des Blutserums bei verschiedenen gesunden und kranken Zuständen. (Centralbl. f. Bakt. etc. I. Abt. 1901. No. 25. p. 948.)
127) Sabazès et Fauquet, Action de l'urine sur les globules rouges. (Compt. rend. des séances de la Société de Biologie. T. LIII. 1901. p. 273.)
128) — —, Propriétés hématolytiques de la première urine émise par le nouveau-né. (La semaine médicale. 1901. No. 14. p. 109.)
129) Sachs, Hans, Immunisierungsversuche mit Immunkörpern beladenen Erythrocyten. (Centralbl. f. Bakt. etc. I. Abt. Bd. XXX. 1901. No. 13. p. 491.)
130) — —, Giebt es einheitliche Alexinwirkungen? (Berl. klin. Wochenschr. 1902. No. 9. p. 182.)
131) — —, Neuere Untersuchungen über die Hämolysine des Blutserums. (Fortschr. d. Med. 1901. No. 18.)
132) — —, Giebt es einheitliche Alexinwirkungen? (Berl. klin. Wochenschr. 1902. No. 9. p. 182.)
133) Salvioli, J., Degli effetti dell' iniezione Indovenosa dell' estratto di ghiandola genitale maschile sulla coagulazione del sangue e sul valore spermotossico del siero. Note preventiva. (Gazzette degli ospedali e delle cliniche. 1902. No. 4. p. 28.)
134) Savtchenko, J.-G., Du rôle des immunisines (fixateur) dans la phagocytose. (Ann. de l'Inst. Pasteur. T. XVI. 1902. No. 2. p. 106.)
135) Schütze, Albert, Beiträge zur Kenntnis des zellenlösenden Sera. (Deutsche med. Wochenschr. 1900. No. 27. p. 431.)
136) Schütze, Albert und Scheller, Robert, Ueber im normalen Serum vorkommende globulicide Substanzen. (Zeitschr. f. Hygiene und Infektionskrankheiten. Bd. XXXVI. 1901. Heft 2. p. 270.)
137) Shibayama, A., Einige Experimente über Hämolysine. (Centralbl. f. Bakt. etc. I. Abt. Bd. XXX. 1901. No. 20. p. 760.)
138) Stern, S., Ueber den Nachweis menschlichen Blutes durch ein Antiserum. (Deutsche med. Wochenschr. 1901. No. 9. p. 135.)
139) Strauss, H. und Wolff, W., Ueber das hämolytische Verhalten seröser Flüssigkeiten. (Fortschr. d. Med. Bd. XX. 1902. No. 1. p. 7 und No. 7. p. 209.)
140) Surmont, H., Sur la préparation d'une cytotoxine pancréatique. (La presse médicale. 1901. No. 35. p. 177.)
141) Tarassévitch, L., Sur les cytases. (Ann. de l'Inst. Pasteur. T. XVI. 1902. No. 2. p. 127.)
142) Trommsdorf, Richard, Können von lebenden Leukocyten Alexine secerniert werden? (Arch. f. Hygiene. Bd. XL. 1901. p. 382.)
143) Tschistowitsch, F. J., Die Rolle der Immunisierungsstoffe und der Agglutinine in der passiven Immunität. (Izwestja Imperatorskoj Wojenno-Medicinskoj Akademji. 1901. No. 2. p. 101.) [Russisch.]
144) — —, Die Lehre vom Verhalten des Organismus gegen fremde tierische Zellen und Säfte. (Ibid. 1900. No. 1. p. 31.) [Russisch.]

145) Uhlenhuth, Eine Methode zur Untersuchung der verschiedenen Blutarten, im besonderen zum differential-diagnostischen Nachweise des Menschenblutes. (Deutsche med. Wochenschr. 1901.)
146) — —, Weitere Mitteilungen über meine Methode zum Nachweise von Menschenblut. (Ibid. 1901. No. 17.)
147) — —, Weitere Mitteilung über die praktische Anwendung meiner forensischen Methode zum Nachweis von Menschen- und Tierblut. (Ibid. 1901. No. 30. p. 499.)
148) Walker, E. W. Ainly, Immunisation against immune serum. (The Journal of Pathology and Bacteriology. Vol. VIII. 1902. No. 1. p. 34.)
149) Wassermann, A., Ueber die natürliche und künstliche Immunität. (Zeitschr. f. Hygiene u. Infektionskrankheiten. Bd. XXXVII. 1901. Heft 2. p. 173.)
150) Wassermann, A. und Schütze, Albert, Ueber eine neue forensische Methode zur Unterscheidung von Menschen- und Tierblut. (Berl. klin. Wochenschr. 1901. No. 7. p. 187.)
151) Wechsberg, Friedrich, Zur Lehre von der natürlichen Immunität und über baktericide Heilsera. (Zeitschr. f. Hygiene u. Infektionskrankheiten. Bd. XXXIX. 1902. Heft 1. p. 171.)
152) — —, Ueber die Wirkung baktericider Immunsera. (Wien. klin. Wochenschr. 1902. No. 13. p. 337.)
153) Weichardt, Moderne Immunitätslehre mit besonderer Berücksichtigung der für den praktischen Arzt wichtigen Immunisierungen. (Münch. med. Wochenschr. 1901. No. 52. p. 2097.)
154) Wlaëff, L'actirn des différentes humeurs de l'organisme animal sur les blastomycètes. (Compt. rend. de séances de la Société de Biolog. T LIV. No. 12. p. 412.)
155) — —, Action des humeurs de l'homme sur les blastomycètes. (La presse méd. 1902. No. 31. p. 369.)
156) Zuelzer, G., Zur Frage der biologischen Reaktion auf Eiweiß in Blut und Harn. (Deutsche med. Wochenschr. 1901. No. 14. p. 219.)

Anhang.

Während der Korrektur sind folgende Arbeiten erschienen:

1) Ascoli, G. und Figuri, Ueber Nephrolysine. (Berl. klin. Wochenschr. 1902. No. 24. p. 560.)
2) Camus, Jean et Pagniez, Recherches sur les propriétés hémolysantes du sérum humain. (Compt. rend. d. séances de la soc. de biol. T. LIV. 1902. No. 17. p. 559.)
3) Carducci, A., Contributo alle emolisine. (Policlinico. Suppl. 1902. 19 aprile. p. 774.)
4) Castaigne, J. et Rathezy, Lésions des reins produites par injection d'émulsion rénale ou de sérum nephrotoxique. (Compt. rend. d. séances de la soc. de biol. T. LIV. 1902. No. 17. p. 563.)
5) Ceconi, A. e Robecchi, P., Cytotoxina ovarica. (Riforma medica. Vol. III. 1902. No. 65 e 66.)
6) Celli, A., Carducci, A. e Casagrandi, O., Primi tentativi di ricerca di una emolisina nella malaria. (Atti per la società della malaria. Vol. III. 1902.)
7) Centanni, E., Il neuro-siero: Siero distruttivo e siero prottetivo pel sisteme nervoso. (Riforma medica. 1900. Vol. IV. p. 374.)
8) Centanni, E. e Ravenna, P., Su un siero cardio-tossico. (Accad. med. chir. di Ferrara. 1902. 27 giugno.)
9) Ehrlich, P. und H. P. Marshall. M. D., Ueber die komplementophilen Gruppen der Amboceptoren. (Berl. klin. Wochenschr. 1902. No. 25. p. 585.)
10) Ehrlich, P. u. Sachs, H., Ueber den Mechanismus der Amboceptorenwirkung. (Berl. klin. Wochenschr. 1902. No. 21. p. 492.)
11) — —, Ueber die Vielheit der Komplemente des Serums. (Berl. klin. Wochenschr. 1902. No. 14 u. 15.)
12) Eisenberg, Philipp, Untersuchungen über spezifische Präcipitationsvorgänge. (Centralbl. f. Bakt. etc. 1. Abt. Orig. Bd. XXXI. 1902. No. 15. p. 773.)
13) Kraus, R., Ueber Bakteriohämolysine und Antihämolysine. (Wien. med. Wochenschr. 1902. No. 15. p. 382.)
14) Landsteiner, Karl und Caldo, Arturo, Zur Kenntnis der Bakterien des normalen Pferdeserums. (Centralbl. f. Bakt. etc. 1. Abt. Orig. Bd. XXXI. 1902. No. 15. p. 781.)
15) Levanditi, C., Contribution à l'étude de l'anémie expérimentale, état de la cytase hémolytique dans le plasma des animaux normaux. (Annales de l'Institut Pasteur. T. XVI. 1902. No. 4. p. 233.)

16) Marshall, Ueber Differenzierung von Komplementen durch ein Partialantikomplement. (Centralbl. f. Bakt. etc. 1. Abt. Orig. Bd. XXXI. 1902. No. 12. p. 570.)
17) Minovici, St., Ueber die neue Methode zur Unterscheidung des Blutes mittels Serum. (Deutsche med. Wochenschr. 1902. No. 24. p. 429.)
18) Notel, Ueber die Entdeckung des Pferdefleisches durch den biologischen Weg. (Zeitschr. f. Hyg. 1902. p. 371.)
19) Nuttall, G., Progress report upon the biological for blood as applied to over 500 bloods from various sources. (Brit. med. Journ. 1902. No. 2153. p. 825.)
20) Nuttall and Dinkelspiel, On the formation of specific antibodies in the blood following upon treatment with the sera of different animals together with their use in legal medicine. (Journ. of hyg. Vol. I. p. 367.)
21) Pace, Contributo alla conoscenza dei sieri emolitici. (Rivista critica di clin. med. 1901. No. 38—40.)
22) Panzacchi, Sul potere emolitico dell' estratto acquoso dei tumori. (Riforma medica. 1902. Vol. II. No. 49. p. 594.)
23) Petrie, F., A note on the methods of conducting haemolytic experiments. (Lancet. 1902. No. 4094. p. 438.)
24) Piorkowski, Die spezifischen Sera. Eine zusammenfassende Uebersicht der bis Anfang 1902 erschienenen diesbezüglichen Arbeiten. (Centralbl. f. Bakt. etc. 1. Abt. Refer. Bd. XXXI. 1902. No. 18. p. 553.)
25) Ravenna, Osservazioni intorno di sieri citotossici con speciale riguardo al neurosiero. (Riforma medica. 1902. Vol. II. No. 36. p. 422.)
26) v. Rigler, G., Die Serodiagnose in der Untersuchung der Nahrungsmittel. (Oesterr. Chem.-Ztg. 1902. No. 5. p. 97.)
27) Rostoski, J., Ueber den Wert der Präcipitine als Unterscheidungsmittel für Eiweißkörper. (Münchener med. Wochenschr. 1902. No. 18. p. 740.)
28) Silberschmidt, W., Die neueren Ergebnisse auf dem Gebiete der Immunitätstätsforschung. (Korrespondenzbl. f. Schweizer Aerzte. 1902. No. 10. p. 289.)
29) Strube, G., Beiträge zum Nachweise von Blut und Eiweiß auf biologischem Wege. (Deutsche med. Wochenschr. 1902. No. 24. p. 425.)

Corrigenda.

p. 707 des vorigen Bandes Zeile 1 von oben muß es statt „15—20 Minuten" heißen: „5—10 Minuten".

Inhalt.

Originalmitteilungen.

Frommannsche Buchdruckerei (Hermann Pohle) in Jena.

CENTRALBLATT

für

Bakteriologie, Parasitenkunde und Infektionskrankheiten

Erste Abteilung:

Mediz.-hygien. Bakteriologie u. tier. Parasitenkunde

Originale

In Verbindung mit

Geh. Med.-Rat Prof. Dr. Loeffler, Prof. Dr. R. Pfeiffer, Prof. Dr. M. Braun
Greifswald Königsberg i. Pr.

herausgegeben von

Dr. O. Uhlworm in Berlin W., Schaperstr. 2/3 I

Verlag von Gustav Fischer in Jena

XXXII. Band. —— Jena, den 12. August 1902. —— No. 3.

Preis für den Band (50 Bogen) 15 Mark. Schwierige Tafeln werden einem Bogen gleich gerechnet. — Die Nummern erscheinen zwanglos je nach dem vorliegenden Stoffe.
Bei Einzelverkauf Preis für einen einfachen Druckbogen 40 Pfg., für eine Tafel 60 Pfg.

Hierzu als regelmäfsige Beilage die Inhaltsübersichten der II. Abteilung des Centralblattes.

Die Redaktion des „Centralblatts für Bakteriologie und Parasitenkunde" richtet an die Herren Mitarbeiter die ergebene Bitte, etwaige Wünsche um Lieferung von besonderen Abdrücken ihrer Aufsätze entweder bei der Einsendung der Abhandlungen an die Redaktion auf das Manuskript schreiben zu wollen oder spätestens nach Empfang der ersten Korrekturabzüge direkt an den Verleger, Herrn Gustav Fischer in Jena, gelangen zu lassen.

Original-Mitteilungen.

Die wichtigsten Methoden der Bakterienfärbung in ihrer Wirkung auf die Membran, den Protoplasten und die Einschlüsse der Bakterienzelle.

[Arbeit aus dem Botanischen Institute der Universität Marburg.]

Von **Arnold Grimme,**
Kreistierarzt in Melsungen (Hessen-Nassau).

Mit 2 Tafeln.

(Fortsetzung.)

Die Untersuchung der lebendfrischen Zellen von B. tumescens, B. cohaerens und dem Thimotheebacillus hatte dagegen ergeben, daß Cytoplasma und Membran in allen Entwickelungs- und Altersstadien kräftig gefärbt blieben. Wurde jedoch in etwas wässerig gewordenem

absolutem Alkohol die Entfärbung fortgesetzt, so traten bestimm
Differenzierungen auf. Membran und Cytoplasma von B. tumescen
entfärben sich gleich schnell, und zwar geht diese Entfärbung am schnellst
vor sich an den Sporangien und Ruhestäben. Viel langsamer erfolgt
an den Keimstäben, die nach etwa einstündiger Einwirkung noch ei
sehr kräftige Färbung behalten haben, während Cytoplasma und Membr
der Ruhestäbe und Sporangien sie schon völlig nach dieser Behandlu
abgegeben haben. Noch nichts von der Farbe haben die Sporenanlage
der Sporangien und ebenso die älteren und ausgewachsenen Sporen ei
gebüßt. Die Sporenanlagen und Sporen von B. cohaerens verhalte
sich in jener Beziehung ganz anders; sie entfärben sich schon nach vi
kürzerer Einwirkung des Alkohols fast vollständig. Die Reservestoff
welche von B. cohaerens und B. tumescens gespeichert werde
Glykogen und Fett nehmen nach dieser Methode keine Färbung an. Si
werden allerdings dort, wo sie noch von einer reichlichen Plasmaschich
umgeben sind, völlig verdeckt. Daher wird es auch kommen, daß di
glykogenhaltigen Teile von B. cohaerens selbst nach teilweiser Ent
färbung noch einen helleren, der Gram-Farbe entsprechenden Farbento
aufweisen.

Von den Bakterien, welche die Färbung nach der Gram'schen Methode nicht behalten, untersuchte ich Pseudomonas spec. und Spirillum volutans. Diese verlieren die Farbe sofort in Alkohol, auch wenn dessen Einwirkungsdauer sehr abgekürzt wird. Auch die einfache Anilinwassergentianaviolettfarbe wird vom absoluten Alkohol, selbst von dem über gebranntem Kupfersulfat gehaltenen völlig wasserfreien, entgegen der Behauptung von Joest (1901. p. 18) schnell herausgelöst. Nur die in diesen Bakterien enthaltenen Volutanskugeln (siehe später) bleiben bei der Anilinwassergentianaviolettfärbung dunkelviolett gefärbt.

Aus meinen Beobachtungen geht demnach hervor, daß bei den Bakterien, welche sich der Gram'schen Methode gegenüber positiv verhalten, der Farbstoff zunächst von dem Cytoplasma festgehalten wird; bei lebendfrischen Bakterien hat auch die Membran dieselbe Eigenschaft. Ueberhaupt nicht färben sich die Schleimschicht der Membran und die Reservestoffe Fett und Glykogen; sie verhalten sich der Gram'schen Methode gegenüber ebenso wie fast allgemein bei den einfachen Anilinfärbungen. Auf der anderen Seite zeigen ein besonderes Verhalten die verschiedenen Entwickelungsstadien der sporenbildenden Bacillen, insbesondere die des Bacillus tumescens. Am zähesten wird die Gram-Färbung zurückgehalten von dem Sporenprotoplasten, weniger aber doch noch kräftig vom Protoplasma der Keimstäbe, bedeutend schwächer vom Cytoplasma der Ruhestäbe und am schwächsten von dem der Sporangien. In letzteren zeigen jetzt wieder die Sporenanlagen, selbst die jüngsten, ein äußerst kräftiges Festhalten der Farbe.

Nach Günther's Auffassung (1898. p. 146) bringt die Färbung nach Gram nur den Protoplasmakörper der Bakterien, nie die Kapseln derselben gefärbt zur Anschauung. Ob Günther an dieser Stelle unter Protoplasmakörper das Protoplasma + Membran verstanden hat und unter Kapsel nur die Schleimhülle oder ob er das Protoplasma einer aus Membran und Schleimschicht bestehenden Kapsel gegenüberstellt, ist mit Rücksicht auf die von ihm (p. 9) gegebenen Definitionen nicht klar. Er spricht an dieser Stelle von dem Protoplasmakörper, der von einer Membran (Plasmahülle) umschlossen ist und ferner von der schleimigen Hülle, die er auch als Kapsel bezeichnet.

Daß die Gram'sche Methode eine spezifische Reaktion für Plasmateile abzugeben imstande ist, wurde schon von Braem (1890) hervorgehoben. Derselbe fand ebenfalls, daß die degenerierenden Milzbrandbacillen sich nach der Gram'schen Methode ungleichmäßig färben und sah ebenso, wie ich es von B. cohaerens beschrieben habe (p. 14), gleichsam nur durch blauschwarz gefärbte unregelmäßige Massen oder Körnchen die Lage eines Stäbchens angedeutet. Mir ist es gelungen, durch eine Doppelfärbung auch wieder die Membran von B. cohaerens zur Anschauung zu bringen. Ich fand auf diese Weise auch leere Membranen, die nicht eine Spur von Plasmaresten mehr enthielten (Fig. IX *e*). Auf einen gleichen Zustand muß ich auch die bereits von R. Koch (1881) in einem Schnitt durch einen Milzbrandkarbunkel gesehenen Bilder von Milzbrandbacillen zurückführen. Derselbe fand diese Bacillen nach der Gram'schen Methode verschiedenartig gefärbt und zwar lagen die gut gefärbten Stäbchen im Innern der Geschwulst. An der Oberfläche des Karbunkels lag eine Schicht von Bacillen, welche dunkle Punkte auf hellem Grunde zeigten und am weitesten nach außen solche Stäbchen, die kaum eine Andeutung solcher Punkte zu erkennen gaben. Der damaligen Auffassung entsprechend denkt Koch an Sporenbildung, läßt aber die Frage offen. Unna (1888) dagegen hält diese Erscheinung für den Ausdruck der sogenannten Kokkenstruktur der Bacillen. Nach dem, was wir jetzt vom Bau des Bakterienprotoplasma und von dessen Veränderungen wissen, nehme ich an, daß jene aus dem Gewebe des Anthraxkarbunkels nach außen gelangten Bacillen abgestorbene und degenerierte waren, deren Protoplasmareste die Gram-sche Färbung noch behielten. Eine ähnliche Beobachtung machte Cahen (1901) an älteren Kulturen seines B. bifidus.

Die Erklärungsversuche, die betreffs der differenzierenden Wirkung des Gram'schen Verfahrens gegeben wurden, sind verschiedener Art. Gram selbst versuchte eine Erklärung nicht. Gottstein (1885) führte die Wirkung dieser Methode, nämlich die, daß der ursprüngliche Farbstoff sich in den im Gewebe liegenden Bakterien erhielt, während er aus den Gewebszellen und sogar aus den Zellkernen durch den Alkohol wieder herausgelöst wurde, auf die entfärbende Wirkung des Jodkaliums zurück. Der Farbstoff solle durch das Salz aus dem Gewebe ausgefällt und in dieser Lockerung dann durch den Alkohol leicht gelöst und fortgespült werden. Unna (1888) fand, daß die Verbindungen der Rosaniline mit dem Jod lockere, die der Pararosaniline mit dem Jod dagegen feste sind. Letztere Farbstoffe besitzen eine überaus starke Affinität zum Jod, welches in der Jodjodkaliumlösung im freien Zustande in Wirksamkeit tritt, denn die Jodjodkaliumlösung kann, wie schon Gram fand, weder durch Jodtinktur noch durch einfache Jodkaliumlösung ersetzt werden. Nach Unna's Ansicht tritt bei Anwendung der Gram'schen Methode die dreifache Verbindung von „Gewebe + Pararosanilinsalz + Jod im Innern der Bakterien" auf; bei der Durchspülung mit Alkohol bleibt bei einer Anzahl von Bakterien diese dreifache Bindung bestehen, während aus dem tierischen Gewebe die Jodpararosanilinverbindung als Ganzes ausgeschwemmt wird. Jod und Pararosanilinsalz können nicht mehr getrennt werden. Dieser Auffassung gegenüber steht die von Alfred Fischer (1899), welcher die differenzierende Wirkung der Gram'schen Methode für eine rein physikalische hält. Er begründet diese Ansicht mit der Beobachtung, daß die Granula einer von ihm künstlich gefällten Albumose genau der Granulagröße entsprechend die Gram'sche Farbe

behalten oder abgeben. Die großen Granula widerstehen der Entfärbung länger als die kleinen; letztere nehmen eine Gegenfärbung an, ebenso die entfärbten Ränder der großen. Eine solche Entfärbung könne nur durch rein physikalische Ursachen bedingt werden. Eine Entscheidung darüber, daß die differenzierende Wirkung der Methode auf physikalischen Ursachen beruhe, ist dadurch keineswegs erbracht, denn die Bestandteile des Bakterienplasma und des Gewebeplasma sind doch nicht ohne weiteres größeren oder kleineren Albumosekugeln gleichzusetzen. Nehmen wir an, die Sporenanlagen von B. tumescens blieben nur infolge ihres dichteren Gefüges so lange kräftig blauschwarz gefärbt, während das Gefüge des Protoplasten des betreffenden Sporangium infolge Abgabe bestimmter Stoffe an die Spore lockerer geworden sei, so wäre doch bei rein physikalischer Färbung der Sporenanlage zu erwarten, daß diese Färbung allmählich vom Rande her dem wässerigen Alkohol zugänglich würde. Da nicht daran zu zweifeln ist, daß der wässerige Alkohol in das Zellplasma eingedrungen ist und die Sporenanlage direkt berührt, da ferner diese Sporenanlagen noch membranlos sind, so müßte man beobachten können, daß dieselben sich allmählich von der Peripherie her entfärben, wie es die Fischer'schen Granula thun. Da ich solche Erscheinungen niemals bei längerer Einwirkung des wässerigen Alkohols bemerkt habe, sondern der scharfe, glatte Rand der Sporenanlage stets mit tief blauschwarzer Farbe sich unmittelbar gegen das ungefärbte Plasma des Sporangium abgrenzt, so muß ich daraus schließen, daß in diesem Falle die Gram'sche Methode nicht allein physikalischen Ursachen ihre Wirkung verdankt. Ebensowenig würde man sich vorstellen dürfen, daß ein und dieselbe chemische Verbindung im heller gefärbten Cytoplasma in geringerer Menge enthalten sei als in den Sporenanlagen und daß die Sporenanlagen deshalb länger gefärbt blieben, denn auch dann würde man eher eine Entfärbung des Randes der Sporenanlagen erwarten müssen.

Im folgenden gebe ich zwei Versuche wieder, die ich anstellte, um die Entscheidung zu treffen, ob der Membran und deren Schleimschicht oder den Eiweißkörpern des Protoplasten irgend welche Beteiligung am Zustandekommen jener Reaktion zuzuerkennen sei. Es war nicht ohne weiteres abzuweisen, daß die Membran der nach der Gram'schen Methode gefärbt bleibenden Bakterien bei der Behandlung mit Alkohol eine Mitwirkung haben könne in dem Sinne, daß sie die wässerigen Farben und Reagentien hindurchlasse. Es war die Membran von B. tumescens und B. cohaerens verhältnismäßig dicker als die der Pseudomonasarten und besonders der Spirillen. Es war vorzüglich nicht ausgeschlossen, daß eine Schleimschicht ein Eindringen des Alkohols in das Protoplasma verhindere. Daß dies jedoch sich nicht so verhält, geht schon aus der Beobachtung hervor, daß Präparate von B. tumescens, die mit Anilinwassergentianaviolett (ohne Jodbehandlung) gefärbt waren, sich in absolutem Alkohol (auch in völlig wasserfreiem) bis auf die violetten Sporenanlagen fast völlig entfärbten. Die Schleimschicht war noch nachzuweisen. Der Alkohol war also leicht durch die Schleimschicht und durch die Membran selbst hindurchgegangen. Andererseits war in Präparaten desselben Bacillus die Gram'sche Färbung noch recht gut eingetreten, obwohl ich die Schleimschicht durch kurzes Aufkochen in 5-proz. Salzsäure entfernt hatte. Hieraus war zu schließen, daß die Membran und speciell deren Schleimschicht zu dem positiven oder negativen Verhalten der Bakterien zur Gram'schen Färbung nicht in Beziehung steht.

Zur Beantwortung des zweiten Punktes wurden Verdauungsversuche in Pepsin-Salzsäurelösung (Pepsinum hydrochloricum solutum 100 Proz. Merck, Salzsäure āā 0,25 g, Aqua destillata 50 ccm) und Trypsinlösung nach Salkowski (siehe Mandel. 1897. p. 40) angestellt. Nach einer 6 Tage langen Einwirkung der Verdauungsflüssigkeit bei 28 und 40° C auf die angetrockneten und fixierten Präparate, welche mit Material junger Tumescens-Kulturen dünn bestrichen waren, trat die Gram'sche Reaktion ebenso kräftig und allgemein wie sonst ein. B. Ellenbachensis Stutzer und der Thimotheebacillus verhielten sich ebenso. Die Deckgläser wurden an Korkstücken, die auf der Verdauungsflüssigkeit schwammen, so in Einschnitten befestigt, daß sie zwischen sich größere Zwischenräume lassend völlig untertauchten. Es geht aus diesen Versuchen hervor, daß eine längere Verdauung den Bakterien die Fähigkeit, nach Gram sich zu färben, nicht nimmt.

Ferner wurden mit Natriumcarbonatlösung (5 Proz.) und Kalilauge (1 Proz.) Versuche an etwa 24 Stunden alten Zellen von B. tumescens angestellt, um zu sehen, ob die physikalische Plasmastruktur das für die Färbung Maßgebende sei oder ob eventuell ein in diesen Reagentien löslicher oder durch sie zerstörbarer Stoff vorhanden sei, der die Färbung bedinge. In kleine Reagensröhrchen, welche mit obigen Lösungen gefüllt waren, brachte ich je eine Oese voll des Materials und erhitzte 3–5 Minuten lang bei 100° C im Wasserbade. Alle Bacillen ließen sich auch jetzt noch gut nach Gram färben.

Aus dem Gesagten geht also hervor, daß die Eigentümlichkeit gewisser Bacillen, bei Anwendung der Gram'schen Methode gefärbt zu bleiben, oder die anderer, sich zu entfärben, nicht an bestimmte Eigenschaften der Membran geknüpft ist. Auch ist kaum anzunehmen, daß physikalische Eigenschaften des Cytoplasma die bedingenden sind, da die Pepsinverdauung und Kalilauge nichts an der Färbung ändert. Es ist aber nicht unwahrscheinlich, daß im Cytoplasma der Sporenanlagen und ähnlichen alkoholfesten Cytoplasmamassen eine chemische Verbindung von Jod + Pararosanilinsalz + einem durch heiße Salzsäure (siehe oben), 1 Proz. Kalilauge, 5 Proz. Natriumkarbonat (siehe oben), Pepsin, Trypsin (siehe oben) nicht veränderbaren Körper entsteht, der relativ schwer löslich in Alkohol ist.

Die Säurefestigkeit.

Kurz nach der Entdeckung der Tuberkelbacillen durch R. Koch fand Ehrlich (1882) bei Färbung dieser Bakterien mit anilinhaltigen Farblösungen, daß sie die Einwirkung starker Säurelösungen vertrugen, ohne sich zu entfärben. Seitdem galt diese Säurefestigkeit für eine charakteristische Eigenschaft der Tuberkelbacillen, welche zunächst nur vereinzelten anderen weniger wichtigen Bakterien und diesen auch nur in beschränkterem Maße zukam. Erst in den letzten Jahren ist eine Reihe von Bakterien gefunden worden, welche die Säurefestigkeit im gleichen Grade besitzen wie der Tuberkelbacillus.

Die Erklärungen, welche man für jenes eigentümliche Verhalten der nach besonderen Vorschriften gefärbten Tuberkelbacillen den Säuren gegenüber zu geben versucht hat, sind der verschiedensten Art. Ehrlich selbst (1882) glaubte, daß die Säurefestigkeit auf der Undurchlässigkeit der Membran für Säuren beruhen müsse. Jedoch konnte schon Ziehl (1882), der die Tuberkelbacillenfärbung durch Verwendung von Karbol-

säure (Karbolfuchsin) sehr vereinfachte, durch direkte Beobachtung nachweisen, daß die Salpetersäure thatsächlich in das Innere der Bacillen eindringt. Seitdem gilt die Hüllentheorie Ehrlich's für widerlegt. Bitter (1886. p. 252) sucht die Ursache für das eigenartige färberische Verhalten bei den Tuberkelbacillen in der Substanz des Bacillus selbst, bei den Smegmabacillen in den Eigenschaften des umgebenden Mediums und führt für diese Behauptung folgende Gründe an. Die Beobachtung, daß bei längerer Einwirkung der Salpetersäure alle im Präparate befindlichen Tuberkelbacillen allmählich und gleichmäßig entfärbt würden, während bei den Smegmabacillen die weitere Entfärbung sprungweise, also ziemlich plötzlich bei einer gewissen Zahl von Bakterien vor sich gehen solle, während die anderen noch völlig säurefest bleiben, spreche für seine Auffassung. Auch sollen die mehr freiliegenden Smegmabacillen empfindlicher gegen die Säure sein als diejenigen, welche im Smegma selbst eingebettet sind. Diesen Bacillen würde also ihre Säurefestigkeit durch Eigentümlichkeiten des Nährbodens verliehen werden. Auch sei eine lichtbrechende farblose Hülle an den Bakterien unter dem Mikroskop direkt wahrzunehmen. Jedoch könne man auch beobachten, daß sofort nach Zusatz von Salpetersäure die Bacillenfarbe zuerst in hellblau, grün und gelb verwandelt und schließlich farblos würde; aber die rote Farbe kehre nach Wasserzusatz zurück (Oxydation des Farbstoffes). Der durch Salpetersäure veränderte Farbstoff ist aber in Salpetersäure selbst schwer löslich und kann daher erst allmählich aus den Zellen herausgelöst werden. Die Empfindlichkeit der Smegmabacillen gegen Alkohol könne man dadurch erklären, daß der in Alkohol sehr leicht lösliche Farbstoff nun auch leicht aus der Zelle herausdiffundieren könne, weil durch Alkohol zugleich der die Undurchlässigkeit der Membran bedingende Stoff gelöst werde; denn häufig werde durch Aufenthalt in absolutem Alkohol und Aether den Bacillen die Säurefestigkeit genommen. Bitter vermutet, daß es ein fettähnlicher Stoff sei, der die Membran durchtränkt. Bienstock (1886) und Spina (1887) suchten die Säurefestigkeit ebenfalls durch Annahme einer Fetthülle, die die Bakterien umschlösse, die Färbung selbst zunächst erschwere und dann die Bacillen vor Entfärbung in wässerigen Flüssigkeiten schütze, zu erklären, weil es ihnen gelang, durch Züchtung auf fetthaltigen Nährböden (z. B. Butteragar) bei gewissen Bakterien eine Säurefestigkeit zu erzeugen. Gottstein (1886) und andere trennen bereits sehr richtig diese künstliche Säurefestigkeit von der natürlichen, besonders aber wendet sich Grigorjew (1886) gegen die Folgerung Bienstock's, daß die Tuberkelbacillen nur deshalb säurefest seien, weil sie von einer Fettschicht, die den Durchtritt der Säure hindere, umgeben seien. Grigorjew kultivierte ebenfalls verschiedene Bakterienarten auf fettreichen Nährböden und konnte nachweisen, daß nur die unmittelbar im Fett selbst liegenden Stäbe Säurefestigkeit besitzen. Durch Einwirkung von Alkalien, Alkohol oder Aether verloren jedoch diese wieder jene Eigenschaft, die Tuberkelbacillen aber nicht. Grigorjew konnte auch durch Verreiben eines Fetttröpfchens mit Bakterien auf dem Deckglase diese säurefest machen. Er verwirft daher mit Recht den Bienstock'schen Erklärungsversuch für die spezifische Tuberkelbacillenfärbung. Unna (1888) tritt energisch für eine chemische Theorie, die jedoch auch schon Ehrlich neben seiner physikalischen zuließ, ein, indem er den 3 Ehrlich'schen Hauptsätzen, daß 1) die Beize die Bacillenhülle durchgängiger mache, 2) stärkere Mineralsäuren die Hülle relativ langsam durchdrängen

und 3) die Membran unter dem Einfluß der Säure für größere Moleküle fast vollkommen undurchgängig sei, drei ebenso gut mögliche Sätze seiner chemischen Erklärung gegenüberstellt. Diese lassen sich dahin zusammenfassen, daß die unter Einfluß der Beize erfolgte feste Verbindung von Farbstoff und Bacillensubstanz die nur locker gebundene Säure wieder leicht, dagegen schwer den Farbstoff an Lösungsmittel (Alkohol) abgeben solle. Von den folgenden Untersuchern, welche zumeist ihre Aufmerksamkeit schon einem bestimmten im Bakterienprotoplasma enthaltenen Stoffe, der die Ursache für die Säurefestigkeit sei, zuwenden, fand zunächst Hammerschlag (1891), daß mit Kalilauge behandelte Tuberkelbacillen ihre Säurefestigkeit verlieren. In der Meinung, daß der extrahierte Eiweißkörper diese Reaktion bedinge, versucht er diesen isoliert ebenso zu färben; was ihm zwar gelingt, jedoch entfärbt sich derselbe in der Säure. Hammerschlag nimmt an, daß die gegenseitige Anordnung von Eiweiß- und Celluloseteilchen im Bakterienleibe das Festhalten der Farbe bedinge. Klebs (1896) schließt daraus, daß ein aus den Tuberkelbacillen extrahiertes Fett dieselbe spezifische Färbbarkeit und Säurefestigkeit besitze wie die Tuberkelbacillen selbst, daß auch die Säurefestigkeit dieser auf das Verhalten jenes Fettes zurückzuführen sei. Die von Fett befreiten Bacillen sollen nicht mehr jene Reaktion geben. R. Koch (1897) führt die Intensität und Zähigkeit der Färbung der Tuberkelbacillen auf den Gehalt von in Alkohol unlöslichen Fettsäuren zurück. Die letzteren Körper, welche nach Koch's Annahme eine zusammenhängende Schicht im Körper des Bacillus bilden und ihn gegen Eingriffe von außen schützen, sollen die gleiche Farbenreaktion wie die Tuberkelbacillen geben. Nach Behandlung mit heißer Natronlauge, welche die betreffenden Fettsäuren herauslöst, entfärben sich die Bacillen ebenso schnell wie andere. Klein (1900) bezweifelt die Richtigkeit der Auffassung, daß die Gründe für die säurefeste Eigenschaft der Tuberkelbacillen in der Gegenwart einer Fetthülle der Bacillen zu suchen sei, weil in jungen Kolonieen viele Bakterien noch nicht säurefest seien, in älteren dagegen alle. Die Säurefestigkeit werde seiner Ansicht nach durch Produktion gewisser Stoffe im Bacillenkörper bedingt. Diese Stoffe fehlen den jungen Kulturen und sind diese deshalb säureschwach. Marmorek (1901) findet ebenfalls, daß sehr junge Stäbchen der Tuberkelbacillenkulturen sich mit den gewöhnlichen basischen Anilinfarbstoffen im Gegensatz zu den älteren gut färben und daß ferner ein großer Teil von ihnen noch nicht säurefest ist. Er schließt daraus im Gegensatz zu Klein, daß der junge Tuberkelbacillus jene dicke Wachs- oder Fettschicht noch nicht besitze, welche den gewöhnlichen basischen Farbstoffen ebenso wie den Säuren und dem Alkohol die Berührung mit dem Protoplasma unmöglich mache. Daß die in sehr alten Kulturen befindlichen Bacillen sich zum Teil ebenso verhalten, versucht Marmorek auf dieselbe Weise zu erklären. Die Bacillen sollen jetzt die Fähigkeit verloren haben, jene Wachs- und Fetthülle zu bilden. Ramond und Ravant (1900. p. 429) erwähnen, daß Borrel durch längere Behandlung mit heißem Xylol den Tuberkelbacillen die Eigenschaft der Säurefestigkeit entzogen habe und dieselben seien dennoch infektiös gewesen. Ferran habe dagegen gefunden, daß durch Veränderung des Nährbodens, z. B. durch Fortlassen des Peptons, Glycerins oder des Zuckers die säurefeste Eigenschaft sich verlieren könne. Auch nach mehreren Passagen durch verschiedene Bouillons habe Ferran die Säurefestigkeit den Bakterien nehmen können; die-

selben hätten dann sogar ein schnelleres Wachstum gezeigt. Ramond und Ravant sind dagegen diese Versuche nicht gelungen. Dieselben Referenten berichten ferner, daß Gibier ähnlich wie Bienstock es vermocht habe, die Säurefestigkeit auch einem sonst nicht säurefesten Bacillus zu verleihen. Beim Züchten des Tuberkelbacillus zusammen mit dem Rauschbrandbacillus sei letzterer auch säurefest geworden, weil er sich angeblich mit einer Substanz umgab, die er vom Tuberkelbacillus bekam. Helbing (1900. p. 133) wird durch die zufällige Beobachtung, daß Tuberkelbacillen und Bandwurmeier nach der Ziehlschen Karbolfuchsinfärbung die gleiche Säurefestigkeit zeigten, veranlaßt, der Frage näher zu treten, ob vielleicht die Säurefestigkeit beider Objekte durch eine bestimmte, beiden Teilen zukommende chemische Eigenschaft bedingt werde. Er wendet sich zunächst gegen die Fetttheorie, besonders gegen die von Aronsohn (1898) für dieselbe angeführten Gründe. Aronsohn, welcher einen fett- oder wachsartigen Körper aus den Tuberkelbacillen isolierte und zwar in großen Mengen, konnte feststellen, daß auf nicht glycerinhaltigen Nährböden dieser Fettgehalt erheblich abnahm, aber doch die Säurefestigkeit dieselbe blieb. Er sah ferner, daß Alkohol und Aether den Bacillen die säurefeste Eigenschaft nicht nehmen und hält doch an der Auffassung fest, daß ein kleinerer Teil des Fettes, der nicht extrahiert sei, die Säurefestigkeit bedinge. Helbing meint, daß durch Extraktion der größeren Menge des Fettes und dadurch, daß dabei die Säurefestigkeit der Bakterien erhalten geblieben sei, gerade bewiesen werde, daß im Fettgehalt der Bakterien die Ursache für jene Eigenschaft nicht zu suchen sei. Er spricht dagegen die Vermutung aus, daß die Tuberkelbacillen ihre Säurefestigkeit ihrem Gehalt an chitinähnlichen Körpern verdanken, und zwar führen ihn zu dieser Auffassung die beiden folgenden Gründe. Erstens bestehen die Eierschalen der Bandwurmeier aus Körpern der Chitingruppe und zweitens habe Ruppel (1900) in nicht mehr durch gewöhnliche Lösungsmittel extrahierbaren und entfetteten Resten der Tuberkelbacillenleiber, welche noch säurefest sind, Eiweißkörper nachgewiesen, welche ebenfalls den Chitinkörpern nahestehen. Das Vorkommen von Chitin in Pflanzenteilen sei ja auch schon bei gewissen Pilzen nachgewiesen. Den im Vorhergehenden angeführten Auffassungen über die Ursache der Säurefestigkeit, welche sich für das Vorhandensein gewisser Stoffe im Bakterienleibe, die die Säurefestigkeit bedingen, entscheiden, stehen die von A. Fischer (1899. p. 114) und Pappenheim (1901) gegenüber. Beide Autoren halten die Wirkung der Tuberkelbacillenfärbung für eine physikalische, welche mit dem „größeren Substanzreichtum“ „und der daraus sich ergebenden stärkeren Adsorptionskraft“ des Tuberkelbacillenprotoplasmas und dem dichteren Gefüge desselben zusammenhängen. Einen Beweis für seine Behauptung erbringt Fischer nicht, denn die Thatsache, daß sich kleinere Granula seiner Albumosefüllungen schneller entfärben als große, ist doch kein Beweis für eine größere Dichtigkeit der Tuberkelbacillen gegenüber anderen Bakterien.

Aus vorstehenden zahlreichen Angaben über Versuche und Erwägungen, die angestellt wurden, um die Ursachen der Säurefestigkeit zu ergründen, ist ersichtlich, wie mannigfaltig die Schlüsse sind, welche von den Untersuchern zur Beantwortung jener Frage gezogen sind.

Die ersten Untersucher, welche eine Erklärung zu geben versuchten, nahmen das Vorhandensein einer mit besonderen Eigenschaften ausge-

statteten Hülle oder Membran an. Die Ehrlich'sche Annahme einer sonst normalen, aber doch infolge größerer Dichtigkeit undurchlässigen Membran mußte bald fallen, da nachgewiesen wurde, daß die Säure thatsächlich sehr schnell in das Innere der Bakterien eindringt. Um so länger befriedigte die Auffassung Anderer, daß eine Fetthülle die Bakterien umgebe, welche nur heiße Farblösungen hindurchlasse, die Säure und den Alkohol dagegen fernhalte. Von den meisten Autoren wird jedoch die Eigenschaft der Säurefestigkeit in gewissen chemischen Bestandteilen des Zellplasmas gesucht, und zwar entscheiden sich einige auf Grund ihrer Versuche für bestimmte Stoffe, wie Klebs, Unna, Aronsohn und R. Koch für Fettkörper, deren Vorkommen in den Tuberkelbacillen in großen Mengen bereits makrochemisch nachgewiesen war. Hammerschlag will die Eigentümlichkeit der Säurefestigkeit mit dem Verhalten von Eiweißkörpern und Celluloseteilchen in Verbindung bringen; Helbing sogar nimmt das Vorhandensein einer engeren Gruppe von eiweißartigen Körpern, den Chitinstoffen im Plasma als Grund für das Eintreten der Reaktion an. Auf einem anderen Standpunkte stehen Fischer und Pappenheim, die rein physikalischen Eigenschaften der betreffenden Bakterien die Ursache der Säurefestigkeit zuschreiben.

Um einen Einblick in die Ursachen der Säurefestigkeit zu erhalten, ist es notwendig, sich zunächst von den morphologischen Eigentümlichkeiten, die ein solcher Spaltpilz in seinen verschiedenen Altersstadien bietet, Kenntnis zu verschaffen. Ich habe deshalb den Thimotheebacillus, der sich als außerordentlich säurefest erwiesen hatte (siehe p. 16), nach diesen Richtungen hin und soweit es seine Kleinheit zuließ, genau untersucht und die Ergebnisse dieser Untersuchungen bereits (p. 15 und folgende) mitgeteilt. Von denselben muß ich an dieser Stelle nochmals folgende hervorheben. Der Thimotheebacillus speichert Fett in Gestalt von Tropfen oder Kugeln, welche bei der Färbung nach Ziehl als völlig ungefärbte, meist noch lichtbrechende, gegen das gefärbte Plasma scharf abgesetzte Stellen sich darbieten. Die Dicke der Membran ist nicht genau zu ermitteln, sie scheint jedoch verhältnismäßig stark zu sein. Die Membran färbt sich in Sudanlösung schwach rötlich; sie behält aber nach der Ziehl'schen Färbung nur eine schwach rote Farbe. Es geht aus dem Verhalten der fetthaltenden Teile des Thimotheebacillus also schon hervor, daß dieselben nicht säurefest sind. Falls sie die Fuchsinfärbung annehmen, wie es beim Bakterienfett mitunter vorkommt (vergleiche hierzu B. tumescens), so wird jedoch in der 5-proz. Säure und im Alkohol dieselbe völlig wieder abgegeben. Daß die rein weißen Lücken in den Stäbchen nach der Ziehl'schen Färbung thatsächlich durch die Fetttropfen, welche in älteren Glycerinagarkulturen oft eine bedeutende Größe erreichen, bedingt werden, habe ich einwandfrei nachgewiesen.

Zwecks weiterer Prüfung der Frage nach der Natur der Stoffe, welche jene Reaktion hervorrufen, stellte ich folgende Versuche an:

1. Xylol. Eine Behandlung der gut angetrockneten, aber nicht fixierten Präparate oder des frischen Materials selbst in kleinen Reagensgläsern wurde zunächst mittels Xylols vorgenommen. Die Erhitzung erfolgte bei 80° im Wasserbade. Der erste Versuch (5 Stunden) ergab, daß nur ein kleinerer Teil der Stäbchen noch absolut säurefest war, die übrigen hellrosa. Bei der ersten Wiederholung desselben Versuches waren alle Stäbchen noch säurefest; bei einer zweiten Wiederholung waren ebenso wie beim ersten Versuch nur einzelne Stäbchen sowie die

auf Haufen liegenden noch der Reaktion zugänglich, während alle übrigen (die größte Zahl) völlig farblos waren. In einem vierten Versuch (heißes Xylol während 6 Stunden und dann kaltes Xylol während 76 Stunden) war kein Stäbchen absolut säurefest, fast alle jedoch mattrosa. Dieselbe Erscheinung trat ein, wenn das Präparat nach 6 Stunden langer Einwirkung des heißen Xylols und 15 Stunden langer des kalten noch 40 Stunden lang in Wasser bei 28° gehalten wurde, um das in den Stäbchen noch vorhandene Xylol zu entfernen. Es konnte der Einwurf erhoben werden, daß das von den Bakterien vielleicht zurückgehaltene Xylol selbst die spätere Färbung verhindert habe. Jedoch auch unter diesen Vorsichtsmaßregeln entfärbten sich die meisten Bakterien in 5-proz. Schwefelsäure nach 10 Sekunden, nur stellenweise sind noch säurefeste Stäbchen in größerer Zahl vorhanden, sowohl in Gruppen zusammenliegend, als auch einzelne.

Der die Säurefestigkeit bedingende Stoff ist also in Xylol löslich.

2) Alkohol 80-proz. Durch eine Behandlung mit 80-proz. Alkohol während 24 Stunden verloren die meisten der freiliegenden Stäbchen (12 Tage alt) ihre Säurefestigkeit. In anderen waren nur dicke Kugeln noch dunkelrot, alles übrige blaßrosa. Die gehäuft liegenden Stäbe waren dagegen fast alle noch rot gefärbt. Nach einer Einwirkung des Alkohols während 4 Tage waren die Stäbchen durchgängig nicht mehr säurefest, nur hier und da liegen noch einzelne gefärbte; auch die Bacillenhaufen haben noch eine kräftig rote Farbe. Präparate, die aus einer anderen, aber ebenso alten Kultur hergestellt waren, zeigten dagegen mit wenigen Ausnahmen noch eine ungeschwächte Säurefestigkeit. In ungefärbten Präparaten dieser Kultur konnte man viele mit Sudanlösung sich rot färbende Kugeln nachweisen (Fett). In 80-proz. Alkohol (2 Tage lange Einwirkung) sind aber diese Fettkugeln bis auf vereinzelte verschwunden.

Das Fett dieser kleinen Stäbchen läßt sich also mit 80-proz. Alkohol entfernen, der sich färbende Stoff ebenfalls, aber schwieriger.

3) Aether. Die Einwirkung des Aethers hatte die Säurefestigkeit von 12 Tage alten Stäbchen nach 4 Tagen noch nicht verändert. Es waren fast alle kräftig rot gefärbt. Nur vereinzelte Bakterien zeigten eine blasse Farbe oder waren ungefärbt. Wiederholungen des Versuches ergaben dasselbe Resultat.

Mittelst Aether läßt sich der die Säurefestigkeit bedingende Stoff unter Umständen entfernen. Auffallend ist es allerdings, daß die Entfernung der Färbbarkeit durch Xylol, Alkohol oder Aether nicht immer in gleicher Weise bei Präparaten von auf demselben Substrat gezogenen Bacillen gelingt. Die Gründe für diese Schwankungen sind noch zu untersuchen.

4) Salzsäure. Bei Versuchen, die mit 0,5-proz. Salzsäure angestellt wurden, stellte es sich heraus, daß die Thimotheestäbchen nach 3-tägigem Aufenthalt in 0,5-proz. Salzsäure durchgängig säureschwach geworden waren und nur noch eine mattrosa Farbe zeigten, nach 12-tägiger Behandlung mit derselben Lösung dagegen ihre Säurefestigkeit ganz verloren hatten. Die ebenso lange in destilliertem Wasser liegenden Präparate hatten jene Eigenschaft noch völlig behalten.

5. Verdauungsversuche. a) Pepsinlösung. Nach 2-tägiger Einwirkung von 0,5-proz. Salzsäure enthaltender Pepsinlösung (siehe p. 165) bei 28° C ist nur der dritte bis vierte Teil der 5 Tage alten Stäbchen noch säurefest, auch hier besonders an den Stellen, wo sie in Haufen

liegen. Die übrigen sind blaßrosa oder ungefärbt. Dasselbe Resultat ergiebt sich nach 4 Tagen. Vom 5. Tage ab sind nur die größeren Bacillenhaufen noch gefärbt.

b) Trypsinlösung. Eine solche neutrale Verdauungsflüssigkeit stellte ich nach dem Salkowski'schen Verfahren dar (siehe Mandel. 1897. p. 40). Die erhaltene Lösung verdaute bei 40° 1—2 mm dicke Streifen von gekochtem Hühnereiweiß in 24 Stunden völlig.

Die Versuche mit dem Thimotheebacillus wurden in der Art angestellt, daß ich in kleine Reagensröhrchen etwa $^1/_2$ ccm dieser Flüssigkeit einfüllte, mit fein verteiltem Material einer 8 Tage alten Glycerinagarkultur versetzte und bei 40° C unter Lichtabschluß hielt. Um eine Ansiedelung von Bakterien in der Verdauungsflüssigkeit zu verhindern, verwendete ich sterilisierte Röhrchen und setzte der Flüssigkeit einen Tropfen Chloroform zu. Wiederholte Prüfungen der Bakterienmasse ergaben, daß nach 8 Tage langer Behandlung die Thimotheebacillen noch absolut säurefest waren.

Die Verdauungsfermente wirken also auf den die Säurefestigkeit bedingenden Stoff nicht ein. Wohl aber wird er durch 0,5-proz. Salzsäure entfernt.

6. Eau de Javelle. Nach einer 10 Minuten langen Einwirkung von frischer Eau de Javelle-Lösung auf 4 und 23 Tage alte Stäbchen sind diese nicht mehr säurefest. Die Fettkugeln der Stäbchen widerstehen jedoch einer $^1/_2$—1 stündigen Einwirkung und färben sich dann mit Sudanlösung hellrot.

Die meisten dieser Versuche wurden mit dem gleichen Erfolge auch mit dem Bacillus der Geflügeltuberkulose, von dem mir Herr Geheimrat v. Behring in liebenswürdiger Weise Kulturen überließ, angestellt.

Es geht aus den Versuchen hervor, daß höchstwahrscheinlich die Säurefestigkeit der Thimothee- und Tuberkelbacillen auf dem Vorhandensein eines besonderen Stoffes im Cytoplasma der Bakterien beruht. Dieser Stoff ist kein Fett, da er Eau de Javelle zu geringen Widerstand leistet und durch Salzsäure gelöst wird. Das Reservefett der Bakterien wird nicht säurefest gefärbt und ist durch Alkohol leichter zu entfernen als der betreffende Stoff. Zu den Eiweißkörpern scheint der Stoff nicht zu gehören, weil ihn Eiweiß spaltende Fermente nicht verändern. Die Unveränderlichkeit der Färbung durch Fermente spricht auch sehr dafür, daß die Färbbarkeit nicht auf einer physikalischen Eigenschaft des Cytoplasmas beruht, ebenso die leichte Zerstörbarkeit des Färbevermögens durch schwache Salzsäure. Der Stoff müßte sich in der Salzsäure- oder alkoholischen Lösung eventuell makrochemisch nachweisen lassen.

Der die Säurefestigkeit bedingende Stoff besitzt aber die Eigenschaft, sich in 80-proz. Alkohol, Aether, Xylol und $^1/_2$-proz. Salzsäure zu lösen und durch Eau de Javelle zerstört zu werden.

Er verbindet sich ferner, wie man schon wußte, mit dem Fuchsin zu einer in Säuren nicht löslichen Verbindung. Letztere vereinigt sich aber mit den Säuren selbst zu einem gelblich oder anders gefärbten Körper, der sich in Wasser leicht dissociiert.

Interessant ist die Erscheinung, daß die Keimstäbe und die jungen Sporenanlagen von B. tumescens Zopf bis zu einem gewissen Grade eine kräftige Säurefestigkeit zeigen (siehe p. 7 und Fig. II *e* und *f*). Durch diese Erscheinung wurde ich veranlaßt, dieselben Entwickelungsstadien der von Gottheil (1901) beschriebenen sporenbildenden Erdbakterien auf das gleiche Verhalten zu prüfen. Es stellte sich heraus, daß die

Keimstäbe und jungen Sporenanlagen von B. ruminatus A. Meyer et Gottheil, B. mycoides Flügge, B. Ellenbachensis Stutzer, B. graveolens A. Meyer et Gottheil, B. simplex A. Meyer et Gottheil ebenfalls säurefest waren. Bemerkenswert war dabei die Thatsache, daß gerade diese Bacillen Fett als Reservestoff speichern, während die übrigen von Gottheil beschriebenen Erdbakterien, welche in keinem Entwickelungsstadium säurefest sind, Glykogen oder keinen Reservestoff speichern (B. subtilis Cohn, B. cohaerens A. Meyer et Gottheil, B. pumilus A. Meyer et Gottheil, B. fusiformis A. Meyer et Gottheil).

Aehnlichkeiten zwischen Gram- und Säurefestigkeit zeigen sich in folgenden Punkten: Besonders fest ist die Alkoholfestigkeit der Gramfarbe und die Säurefestigkeit der Fuchsinfarbe bei Keimstäben und Sporenanlagen der fettspeichernden Bacillen; die Alkoholfestigkeit der nach Gram gefärbten glykogenspeichernden Bacillen ist dagegen verhältnismäßig gering, eine Säurefestigkeit besteht bei ihnen überhaupt nicht. Die säurefesten Bakterien färben sich nach Gram und entfärben sich in Alkohol schwer.

Die Volutanskugeln.

Bereits im Jahre 1887 fand Paul Ernst bei Untersuchung des B. xerosis eigenartige, anders als der übrige Zellleib gefärbte Körper, die sich nur bei Beobachtung eines bestimmten Färbeverfahrens zeigen sollten. Die Farblösung, die zur Verwendung kam, war Loeffler's Methylenblaulösung. Das mit der Lösung beträufelte Deckglas wurde $^1/_2$ Minute über der Flamme nur soweit erwärmt, bis leichte Nebel von der Flüssigkeit aufstiegen. Nach Abspülung in Wasser wurde eine Kontrastfärbung während 1—2 Minuten in Bismarckbraunlösung vorgenommen. Es zeigten nun die gelb gefärbten Bacillen in ihrem Innern 1—2—3, seltener ganze Reihen von 6—8 tiefblau gefärbten Kügelchen. Schon im ungefärbten Präparate hat Ernst in den Bacillen helllichtbrechende, geradezu leuchtende Kugeln, die in eine mattere Grundsubstanz eingebettet liegen, in reichlicher Zahl gesehen, die er für identisch mit jenen stark gefärbten Gebilden hält. Er sagt jedoch, daß die Zahl der gefärbten geringer sei als die der lichtbrechenden. Daß in dieser Beobachtung eine Verwechselung mit Fetttropfen vorliegen kann, wird später aus der Besprechung meiner Untersuchungen über solche und ähnliche Kugeln hervorgehen. Auch bei Färbung mit Fuchsin konnte Ernst im Innern der Bacillen stärker als der übrige Zellleib gefärbte Körner beobachten. Ernst hält jetzt diese Kugeln für Sporen. Er beobachtet ferner, daß die größte Zahl der blauen Körner am 2. bis 5. Tage des Wachstums der Kultur auftrete, von da ab eine kleine Abnahme der Zahl der Kugeln stattfinde. Aehnliche Gebilde, die er alle für identisch hält, fand Ernst bei Pseudomonas syncyanea (B. cyanogenus), sowie bei einer unbekannten Sarcina und einem ebensolchen Coccus; dagegen fand er sie nicht bei B. anthracis, B. mycoides, B. megatherium und einigen anderen. Auch Neisser (1888) glaubt an Xerosisbacillen „und solchen, die diesen ähnlich sahen“, endogene Sporen gefunden zu haben. Diese „Sporen“ zeigten unter anderem die Eigenschaft, sich mit Karbolfuchsin zu färben und bei einer Behandlung mit 1-proz. Schwefelsäure die rote Farbe zu behalten, eine Eigenschaft, die auch unsere später zu besprechenden Volutanskugeln, mit denen sie vielleicht teilweise identisch waren, besitzen. Babes (1889),

welcher auch schon im Jahre 1887 besonders leicht färbbare Anteile der Bakterienzelle und zwar bei Cholerabacillen beobachtet hatte, untersuchte die sich in Methylenblau stark färbenden Körper bei einer Reihe von Bacillen, Spirillen, Sarcinen und Kokken und bekämpft mit Recht die Ansicht von Ernst über die Sporennatur derselben. Eine bestimmte Meinung über die Bedeutung jener Kugeln hat sich Babes nicht gebildet, glaubt jedoch, daß sie zum Teilungsprozeß und wahrscheinlich auch zur Sporenbildung in irgend welcher Beziehung stehen. Babes färbte die Kugeln ohne Erwärmung allein mit Löffler's Methylenblau; in den hellblauen Stäbchen traten dieselben in dunkelroter oder violetter Farbe sehr deutlich auch ohne Kontrastfärbung hervor. Ernst (1889) gelangt dagegen in einer zweiten Arbeit, seinen früheren Standpunkt verlassend, zu der Ansicht, daß die in der Methylenblaufärbung sich besonders differenzierenden Kugeln und Körner, welche er bei B. butyricus, B. mycoides, B. cyanogenus, B. fluorescens putidus, B. typhi abdominalis, B. tuberculosis, dem Bacillus der Mäuseseptikämie und bei unbestimmten Bakterien eines Heuinfuses findet, als Zellkerne anzusprechen seien. Seine Gründe hierfür sind: 1) sie färben sich mit Hämatoxylin und Platner's Kernschwarz, 2) sie zeigen einen Widerstand gegen die Pepsinverdauung, 3) sie können sich teilen, 4) sie können zu Sporen werden und 5) sie kommen auch bei Oscillarien vor. Er nennt seine Gebilde aber nicht Kerne, sondern sporogene Körner, weil er glaubt, den Nachweis erbracht zu haben, daß sie direkt in Sporen sich verwandeln können, ein Beweis, der, wie ich später zeigen werde, durchaus nicht erbracht ist.

Steinhaus (1889) bestätigt die Funde von Babes und Ernst; was die Deutung der Gebilde anbelangt, schließt er sich der Babesschen Auffassung an. Er will gefunden haben, daß sich blau färbende Kugeln, die er bei B. fluorescens liquefaciens und B. subtilis beobachtet hat, bei ersterer Species zu der Zellteilung, bei letzterer zu der Sporenbildung in Beziehung stehen. Zellkerne seien es deshalb nicht, weil ihnen allem Anscheine nach eine verschiedene physiologische Rolle zukomme, weil sie in Abhängigkeit vom Nährboden ständen und sie auch nur während der Teilung oder zur Zeit der Sporenbildung sichtbar seien. Wie wir sehen werden, kommt er dadurch zu diesem Schlusse, daß er (bei B. subtilis) blau gefärbte Sporenanlagen mit den Körnern zusammengeworfen hat.

Babes stellt in einer späteren Arbeit (1895) fest, daß die Forscher, die sich bis dahin mit der Untersuchung der in Methylenblau blau gefärbten Kugeln beschäftigt haben, übereinstimmend jene Gebilde für eine dem Zellkerne analoge chromatische Substanz halten, welche in Beziehung zu Zellteilung und Sporenbildung steht. Er nennt sie metachromatische Körperchen. Bunge (1895) konnte die von Ernst mittelst der Methylenblau-Bismarckbraunmethode bei B. anthracis und B. megatherium gefundenen und von demselben für identisch mit ähnlich sich färbenden Gebilden anderer Bakterien gehaltenen Körnchen in den genannten Bacillen niemals finden, obwohl er die verschiedensten Nährböden und Wachstumstemperaturen neben peinlich genauer Befolgung des Ernst'schen Rezeptes berücksichtigte. Er folgert daraus, daß die von Ernst beschriebenen Körner, welche sich in Methylenblau-Bismarckbraun fast schwarz färben und in kochender Farblösung verschwinden sollen, bei den beiden eben genannten Bacillen nicht vorkommen und daß die betreffenden von Ernst gegebenen Abbildungen eine andere

Erklärung verlangen. Marx und Woithe (1900) bestreiten ebenso wie Bunge die Ernst'sche Deutung, daß die sogenannten Babes-Ernstschen Körper Sporenvorstufen seien, besonders deshalb, weil sie beim Kochen verschwinden und sporenbildenden Bakterien fehlen sollen. Sie halten sogar das Verschwinden der Körner für gleichbedeutend mit Vernichtung. Die Verfasser finden ferner bei näherer Untersuchung des B. fluorescens liquefaciens, bei dem nach meinen Untersuchungen in der That Volutanskugeln vorkommen, daß die Kugeln am zahlreichsten in frischen Kulturen auftreten und daß sie bei B. prodigiosus z. B. am zahlreichsten und am schönsten rot gefärbt erscheinen in Kulturen, die sich durch starke Farbstoffbildung auszeichnen. Marx und Woithe halten ebenfalls wie einige der früheren Beobachter eine Mitwirkung der Kugeln am Teilungsprozeß der Zellen für sicher, da sich an nicht in Teilung befindlichen Stäbchen meist nur 2 Kugeln und zwar je eine an den Zellpolen nachweisen lassen und ferner bei Fadenbildung eine größere Menge derselben in den Fäden auftritt. Die Auffassung von Marx und Woithe über die Natur der Kugeln geht dahin, daß sie das Auftreten jener Gebilde in möglichst vielen Individuen derselben Art für ein Zeichen der höchsten Lebensentfaltung der betreffenden Species ansehen; sie wollen gefunden haben, daß, je weiter eine Generation von der aus dem natürlichen Substrat gezüchteten entfernt ist, je weniger Babes-Ernst'sche Körper auftreten, daß ferner die Abnahme in der folgenden Generation um so schneller sich vollzieht, je schärfer der Kontrast zwischen den Lebensbedingungen der beiden Generationen ist. Auch haben sie beobachtet, daß innerhalb der ersten 24 Stunden nach der Impfung eine erhebliche Zunahme der Kugeln stattfindet und daß in Symbiosen der Reichtum an Kugeln ein besonders auffallender sei. Endlich vermuten sie, daß eine Beziehung zwischen dem gehäufteren Auftreten der Kugeln bei pathogenen Bakterien und der Stärke von deren Virulenz besteht. Die Verfasser haben solche Kugeln, abgesehen von B. fluorescens liquefaciens und B. prodigiosus auch bei folgenden Arten beobachtet: B. mallei, B. typhi, B. coli, Vibrio Finkler-Prior, Vibrio Metschnikoff.

Krompecher (1901) fand im Milzbrandbacillus neben anderen färbbaren Einschlüssen durch Färbung mit Karbolmethylenblau oder nach dem Ernst'schen Verfahren 1 oder 2 verschieden große blauschwarze Kugeln, die beim Aufkochen der Farblösung verschwanden. In einer Kultur anderer Herkunft fand Krompecher diese Körper, welche er mit den Babes-Ernst'schen identifiziert, erst am 16. Tage nach der Ueberimpfung in angeblich jungen, gut färbbaren Anthraxbacillen. Schließlich hat Krompecher die Babes-Ernst'schen Körper auch in einem anderen sporentragenden Bacillus (B. alvei) und sogar in dessen Sporangien, was bisher noch nie beobachtet zu sein scheint, gesehen.

Ob die von Raum (1891) in Saccharomyces-Arten nach Anwendung der Ernst'schen Färbemethode sichtbar gemachten, teils kugeligen, teils als unregelmäßige Massen auftretenden Gebilde hierher gehören, ist zweifelhaft. Manche Reaktionen sprechen dafür, andere, wie z. B. das negative Verhalten gegen Karbolfuchsin, sowie die Angabe, daß zuckerfreie und glycerinhaltige (6-proz.) Nährböden dem Zustandekommen der Körner hinderlich seien, sprechen dagegen. Nähere Untersuchungen an Saccharomyces-Arten und Vergleiche jener Einschlüsse mit den Reaktionen, welche ich für die Volutanskugeln im folgenden aufgestellt habe, sind zur Klärung dieser Frage erforderlich.

Um die Eigenschaften der bisher als Babes-Ernst'sche Körperchen bezeichneten Kugeln festzulegen und wenn möglich daraus einen Schluß auf die biologische Bedeutung dieser Gebilde zu ziehen, untersuchte ich das Verhalten der von mir bei Spirillum volutans, einer Pseudomonas-Species (eine im Oktober 1900 von Král bezogene Kultur von Ps. erythrospora erwies sich als unrein; es befanden sich zwei verschiedene Pseudomonas-Arten darin) und bei B. alvei, den ich durch die Liebenswürdigkeit des Herrn Dr. Krompecher-Budapest erhielt, beobachteten Kugeln nach verschiedenen Färbemethoden und Reaktionen. Gerade der letztere Bacillus, der jene Kugeln neben einer normalen Sporenbildung zeigt, wie Krompecher (1901) gefunden hatte, schien besonders geeignet. zur Klärung der obigen Frage beizutragen. Gelegentlich wurde auch Ps. syncyanea (B. cyanogenus) zu den Untersuchungen herangezogen. Zuletzt fand ich dieselben Gebilde auch bei B. asterosporus (A. Meyer) Migula und bei B. fusiformis A. Meyer et Gottheil, bei denen sie ebenfalls nicht nur in vegetativen Stäben, sondern auch in Sporangien vorkommen. Ich muß hier besonders betonen, daß ich die Identität der betreffenden, bei den genannten Bakterien vorkommenden Kugeln durch fast alle im Nachstehenden bezeichneten Färbungen und Reaktionen nachgewiesen habe. Ich werde diese Kugeln auf Vorschlag des Herrn Prof. Meyer alle vorläufig als Volutanskugeln bezeichnen, d. h. als solche Kugeln, welche gegen die von mir benutzten Reagentien sich ebenso verhalten wie die Kugeln von Spirillum volutans, welche Species wegen der außergewöhnlichen Größe ihrer Kugeln am bequemsten zur Anstellung der Reaktionen geeignet ist.

Wie aus der Litteraturbesprechung hervorgeht, ist wohl anzunehmen, daß einzelne der früher von den erwähnten Autoren beobachteten und als Kerne, Sporen, Polkugeln u. s. w. bezeichneten Gebilde, die sich mit Methylenblau färben, mit den Volutanskugeln übereinstimmen. Es ist darüber jedoch im speziellen folgendes zu sagen: Ernst (1888) sagt zunächst, daß die Kugeln beim Kochen verschwinden müssen; er hat aber diese Reaktion nicht überall durchgeführt, denn in manchen Fällen hat er zweifellos Sporenanlagen vor sich gehabt. Ich verweise auf seine Abbildungen 8 und 12 (Tafel V), die B. mycoides darstellen. Es handelt sich hier um junge Sporen, deren um den Kern gelagertes Centrum sich noch nicht in die lichtbrechende Substanz verwandelt hat. Solche Bilder sieht man oft bei gewissen sporenbildenden Bakterien. Beim Kochen der Präparate verschwindet die Färbung an diesen Stellen nicht, sondern wird stärker. Schon Bunge (1895) weist treffend auf diesen Unterschied zwischen den von Babes und Ernst gefundenen Körperchen und anderen mit Methylenblau sich färbenden Gebilden hin. Dieselbe Verwechselung mit jungen Sporen scheint Steinhaus (1889) und Babes (1889) passiert zu sein; ersterem bei B. subtilis, letzterem bei den unbekannten Bakterien, die er in den Figuren 19, 24, 34 und 38 wiedergiebt. In manchen Fällen mag auch wohl der in der Sporenvakuole liegende Kern sich ähnlich gefärbt haben. In vielen Fällen scheinen jedoch die gefärbten Kugeln den von mir beschriebenen Volutanskugeln gleich gewesen zu sein. Infolge der vielen Verwechselungen verschiedener, sich mit Methylenblau färbender Körper mit den Volutanskugeln waren auch die Fehler in der Deutung letzterer möglich.

Die Volutanskugeln sind keine Kerne, denn 1) quellen sie in den Anilinfarbstoffen stark auf, 2) ändert sich ihre Größe mit dem Alter der

Bakterienzelle, 3) sind sie oft in derselben Zelle sehr ungleich groß. 4) kann man sie durch bestimmte Reaktionen so verändern, daß sie als gelöst betrachtet werden können, 5) habe ich bei B. asterosporus nachgewiesen, daß die von A. Meyer (1897 und 1899) nachgewiesenen Kerne in der Sporenvakuole nicht mit den Volutanskugeln identisch sind.

Die Volutanskugeln sind ferner keine Sporen oder Sporenanlagen aus folgenden Gründen: Sie treten schon in nur wenige Stunden alten Keimstäbchen von B. alvei auf, in denen Sporen niemals angelegt sind. Sie treten bei derselben Species und anderen neben der in der Regel in Einzahl in der Zelle vorkommenden Sporenanlage direkt und in größerer Zahl auf. Sie färben sich nicht in heißer Methylenblaulösung, während gerade die Sporenanlagen und Sporen durch heiße Farblösungen kräftiger gefärbt werden als durch kalte.

I. Reaktionen der Volutanskugeln.

Im frischen ungefärbten Zustande im Wasser untersucht.

Bei der untersuchten Pseudomonas-Species waren die Kugeln der Größe der Stäbchen entsprechend so klein, daß sie nicht wahrgenommen wurden. Selbst in mehrere Tage alten Kulturen, in denen sie größer geworden waren, konnten sie nicht von den dann ebenfalls aufgetretenen Fetttropfen, mit denen sie in ihrem Lichtbrechungsvermögen fast übereinstimmen, unterschieden werden. Wegen ihrer geringen Größe war diese Unterscheidung selbst nach Anwendung der Fettfärbemittel Sudan und Gelblösung fast oder ganz unmöglich. Leichter war ihre Erkennung bei Spirillum volutans, bei dem sie schon eine ansehnliche Größe, besonders in mehr als 3 Tage alten Kulturen erreichen (Fig. XII*a*, b^1, c^1). Jedoch ist es auch hier noch schwierig, da sie fast ebenso lichtbrechend sind als die Fettkugeln, welche Spirillum besitzt. Diese sind jedoch durch Färbung mit Sudan oder Gelblösung leicht auszuscheiden. Die Volutanskugeln färben sich nicht mit den Fettfarbstoffen. Fetttropfen und Volutanskugeln liegen in der Regel abwechselnd in der Zelle. Oft werden letztere auch von den ersteren verdeckt. In älteren Spirillumzellen habe ich sie zuweilen in der Querrichtung der Zelle bandartig verbreitert gesehen (Fig. XII b^1). Am deutlichsten sind die Kugeln bei B. alvei zu erkennen, bei dem sie in jüngeren Stäbchen vorzugsweise an den Polen liegen, eine ansehnliche, oft den Querdurchmesser der Zelle erreichende Größe besitzen und nicht durch Fett oder andere Zelleinschlüsse verdeckt werden (Fig. XI *a*).

Jodjodkalium. Die Lösung *sch* färbt die Kugeln ebenso wie das Protoplasma gelb. In Jodjodkalium *k* treten die Kugeln scharf hervor als gelbgefärbte, schwächer lichtbrechende Gebilde (hohe Einstellung dunkelgelb, tiefe hellgelb) mit scharfer Begrenzung. Nach der Behandlung mit Jodjodkalium *sch* und Durchspülung mit Wasser tritt eine Färbung der Kugeln noch ein; nach längerer Einwirkung der Lösung *k* färben sich nur noch einzelne derselben.

Methylenblau. In allen untersuchten Fällen treten die Kugeln mit Methylenblau 1 + 10 behandelt als dunkelblaue oder rötlichblaue, scharf begrenzte Kugeln hervor, die bei hoher Einstellung lichtbrechend sind. Die Mitte dieser Kugeln ist oft heller, besonders rötlich gefärbt. Beim Erhitzen der Farblösung bis zum Blasenaufsteigen erscheinen die Kugeln nicht, an ihrer Stelle liegen weiße Lücken; ein Erhitzen bis auf 80° C schadet jedoch in der Regel nicht. Die in Methylenblau gefärbten Kugeln sind bedeutend dicker als im ungefärbten Zustande. Man kann

die Anschwellung bei der Farbstoffaufnahme direkt unter dem Mikroskop verfolgen; es färbt sich zunächst ihre Peripherie intensiv, während das Centrum noch ungefärbt erscheint. In vielen Fällen scheint sich die Peripherie überhaupt stärker zu färben, denn manchmal macht es den Eindruck, als ob in der Mitte der Kugel ein Hohlraum entsteht. Stellt sich der in Farbstofflösung anschwellenden Kugel die Membran entgegen, sei es an einer oder beiden Seiten, so wird die Membran halbkugelig vorgewölbt.

Es bleibt sich gleich, ob kurz oder lang, kalt oder mäßig erwärmt bis zum Aufsteigen leichter Dämpfe gefärbt wird. Schwacher Zusatz von Methylenblau (z. B. einer Spur der starken Lösung zu dem in einem Tropfen Wasser liegenden Präparate, oder Färbung des Präparates mit Methylenblaulösung *v*) färbt auch die Kugeln, aber nicht so kräftig wie Methylenblaulösung 1 + 10; vor allen Dingen tritt dann keine oder nur eine geringe Schwellung ein. Beim Quetschen des gefärbten Präparates gelingt es meist, auch viele der Kugeln zu zerdrücken. Diese sind dann zu unregelmäßig gestalteten Massen breit gequetscht, die dann eine hellweinrote Farbe, seltener auch Vakuolen (weiße Lücken) verschiedener Größe zeigen (Fig. XII *f*). Quetscht man das Präparat vor der Einwirkung des Farbstoffes, so tritt doch in Methylenblau infolge der Quellung eine Abrundung der fraglichen Einschlüsse bis zur Kugelbildung ein (Fig. XII *g*; die hellblau gefärbte Grundmasse ist das Cystoplasma, die gelben Kugeln sind mit Gelblösung gefärbte Fetttropfen). An Stelle des Methylenblau 1 + 10 kann mit demselben Erfolge Löffler's Methylenblau, essigsaures Methylenblau nach Neisser (1 Methylenblau in 20 Alkohol absolutus gelöst, dazu 1000,0 ccm 5-proz. Essigsäure, siehe Levi und Bruns 1901. p. 45) oder Azurblau nach Michaelis (1901) verwendet werden. Auch Karbolmethylenblau nach Kühne (Methylenblau 1,5 g, Alkohol absolutus 10,0 g, Karbolwasser, 5-proz., 100,0 g) färbt die Kugeln blau, aber schlechter (sie bleiben kleiner, sind oft unregelmäßig und unscharf). Mit letzterer Farblösung gefärbt, treten daher die sehr kleinen Kugeln von Pseudomonas meist nicht in die Erscheinung.

Methylenblau + Bismarckbraun 1 + 10 (ursprüngliche Methode nach Ernst, 1888). Zusatz von Bismarckbraun 1 + 10 zu dem in Methylenblau 1 + 10 gefärbten Präparate verwandelt die hellblaue Plasmafarbe in Gelb, während die Kugeln blauschwarz werden (Fig. XII *h*). Dieselben stechen daher scharf gegen den Untergrund ab und sind dort, wo sie vereinzelt auftreten, leichter aufzufinden. Manchmal ist bei diesem Verfahren ihre Umgrenzung unregelmäßig geworden. Fast dieselben Gegensätze der Färbung erzielt man durch Methylenblau + Jodjodkaliumlösung *sch*. Die Kugeln werden sofort tiefschwarz, das Plasma der Zellen hellgelb. Die zerquetschten Kugeln erscheinen grauschwarz oder schwärzlich, mit kleinen helleren Lücken (Fig. XIII *i*, *k*).

Die Methylenblaufärbungen von Volutanskugeln enthaltendem Material habe ich in der Regel in der Weise vorgenommen, daß ich das Deckglaspräparat, auf welchem das Material bei Zimmertemperatur angetrocknet war, ohne vorhergehendes Fixieren in der Flamme mit Methylenblaulösung 1 + 10 beträufelte und nach einer Einwirkung der Farblösung während 2—5 Minuten bei Zimmerwärme in Wasser abspülte und auch in Wasser untersuchte. Das dreimalige durch die Flamme Ziehen war jedoch ohne Einfluß auf den Eintritt der Reaktionen.

Methylviolett oder Gentianaviolett. Diese Farbstoffe färben

die Kugeln ebenfalls stark und zwar dunkelviolett. Es tritt auch hier starke Quellung ein.

Fuchsin 1 + 10. Fuchsin färbt die Volutanskugeln unter Schwellung kräftig rot; dieselben werden aber meist durch die ebenfalls starke Plasmafärbung überdeckt, besonders die kleineren. In heller gefärbten Zellen treten sie dagegen deutlich begrenzt und dunkelrot gefärbt hervor. Die größeren Kugeln färben sich langsam von außen nach innen. Zusatz von Methylenblau verwandelt die dunkelrote Farbe der Kugeln in dunkelviolett, die Plasmafarbe in hellviolett. Karbolfuchsin färbt ebenso, meist aber schneller und kräftiger. In beiden Fuchsinlösungen färben sich die Volutanskugeln auch beim Aufkochen der Lösung, meist schneller und stärker als in der kalten. Auch hier werden die Kugeln von der Plasmafarbe meist verdeckt oder sie treten wenigstens nicht scharf hervor.

Färbung nach Neisser (1888). Die Präparate werden 3 Minuten mit Karbolfuchsin bis zum Dämpfeaufsteigen erhitzt, $^1/_4$—$^1/_2$ Minute in 1-proz. Schwefelsäure entfärbt und mit Methylenblaulösung nachgefärbt. Die Stäbe sind nun rot, die Kugeln blaurot gefärbt. Bei längerer Einwirkung des Methylenblau werden die Stäbe wieder blau.

Bismarckbraun 1 + 10. Nach 5 Minuten langer Einwirkung der kalten Lösung werden die Kugeln kräftig gelb, das Plasma hellgelb gefärbt (Fig. XII *k*).

Safranin 3 Proz. in Wasser. Kugeln gelbrot, Plasma hellrot.

Hämatoxylin Delafield. Diese Farblösung färbt relativ langsam und schwierig. Nach 24 Stunden langer Einwirkung bei Zimmertemperatur haben sich die Kugeln violett gefärbt, teils völlig, teils nur an der Peripherie. Das Cytoplasma ist hellviolett, die Fettkugeln gelblichweiß (Fig. XII *l*).

Eosin, Boraxcarmin, Nigrosin und Kernschwarz färben die Kugeln nicht. Nach 24-stündiger Einwirkung von Kernschwarz sind an Stelle der Kugeln scharf begrenzte Vakuolen, die bei hoher Einstellung grauschwarz, bei tiefer hell erscheinen, zu sehen.

Färbung nach Gram. Es bleibt weder am Plasma noch an den Volutanskugeln irgend eine Färbung bestehen. Durch späteren Zusatz von Methylenblaulösung lassen sich aber die Kugeln wieder hervorrufen (Fig. XII *n*).

Verfolgt man die Reaktionen der einzelnen Agentien, welche bei der Gram'schen Methode Verwendung finden, nacheinander unter dem Mikroskop, so erhält man folgende Bilder (Fig. XII n^1 n^2 n^3). Zur besseren Differenzierung färbte ich die Fettkugeln zunächst mit Gelblösung. Beim Zusatz der Anilinwasser-Gentianaviolettlösung sieht man die zwischen den gelben Fetttropfen liegenden Volutanskugeln, unter Aufnahme einer zuerst violettrötlichen, dann mehr dunkelvioletten Farbe in ihrer Peripherie, sich schnell vergrößern. Je mehr Farbstoff aufgenommen wird, um so mehr verschwindet das helle Centrum der Kugeln, welche nach Erreichung der stärksten Schwellung völlig schwarzviolett geworden sind. Meist sind sie rund, seltener unregelmäßig gestaltet. Nach Zusatz der Gram'schen Jodjodkaliumlösung werden Kugeln und Cytoplasma schwarz; dieser Farbstoff löst sich dann aber in absolutem Alkohol völlig auf.

Schwefelsäure. Mit Methylenblau gefärbte Kugeln werden durch 5-proz. Schwefelsäure gelöst[1]).

1) Als „gelöst" werde ich im folgenden diejenigen Kugeln bezeichnen, die sich nach der „Lösung" in heißem Karbolfuchsin nicht mehr färben; unter „entfärbt" die-

Die mit Karbolfuchsin gefärbten Kugeln verwandeln sich in schwarze, während das Plasma weiß wird. Die schwarze Farbe ist nach $^1/_4$—$^1/_2$ Stunde in der 5-proz. Schwefelsäure verschwunden, die Kugeln sind zugleich gelöst. Ebenfalls lösen sich die mit Methylenblau + Bismarckbraun gefärbten Kugeln langsam. Im ungefärbten Präparate sieht man nach Zusatz von 5-proz. Schwefelsäure an Stelle der lichtbrechenden Kugeln Vakuolen entstehen, die bei hoher Einstellung dunkel, bei tiefer hell erscheinen.

In 1-proz. Schwefelsäure bleiben die mit Methylenblau gefärbten Kugeln gefärbt; sie werden blauschwarz und sind auch nach 3—4-stündiger Einwirkung noch zu sehen. Das Cytoplasma dagegen verblaßt vollständig, die Kugeln treten daher um so schärfer hervor. Das gleiche ist der Fall bei den mit anderen Farbstoffen gefärbten Kugeln; besonders bei der Karbolfuchsinfärbung, die leicht die Kugeln verdeckt, ist eine Differenzierung in 1-proz. Schwefelsäure meist notwendig. Im ungefärbten Präparate erscheinen unter Einwirkung der 1-proz. Schwefelsäure die Kugeln weniger lichtbrechend als das Plasma; nach Zusatz von Methylenblau färben sie sich sofort.

Salzsäure. 1-proz. Säure entfärbt ebenfalls die gefärbten Kugeln nicht; 5-proz. löst sie, desgleichen 1-proz. und $^1/_2$-proz. innerhalb 24 Stunden (bei 28° C).

Essigsäure, 1-proz., verändert ebenfalls die Kugeln nur sehr langsam. Ungefärbt erscheinen sie ebenso wie in 1-proz. Schwefel- und Salzsäure als Vakuolen.

Salpetersäure, 25-proz., zerstört die Kugeln sofort (Vakuolen, keine Färbung mit Karbolfuchsin).

Osmiumsäure, 1-proz. Die Veränderung der Lichtbrechung ist ebendieselbe wie bei den anderen Säuren. Nach 2—3-stündiger Einwirkung der Osmiumsäure färben sich die Kugeln noch mit Methylenblau. In einem anderen Falle trat die Färbung mit Methylenblau schon nach 2-stündiger Einwirkung nicht mehr ein, wohl aber noch die mit Karbolfuchsin.

Kalilauge und Natriumkarbonat entfärben die mit Methylenblau gefärbten Kugeln sofort. Es bleibt ein etwas kleinerer, runder, weißer Fleck zurück, der meist scharf begrenzt ist. Nach Auswaschen des Alkali färbt Karbolfuchsin unter Erwärmen die Kugeln schwarzrot (es war bei diesem Versuch 5-proz. Natriumkarbonat verwendet worden, jedoch nur während 15 Sekunden). Wurde das Präparat 1 Minute lang mit konzentrierter Natriumkarbonatlösung behandelt, nach Abspülung mit Karbolfuchsin erhitzt und vom Rande her 5-proz. Schwefelsäure zugesetzt, so traten noch vereinzelte schwarze Kugeln auf. Nach einer 5 Minuten langen Behandlung mit 5-proz. Natriumkarbonat waren die Kugeln sämtlich gelöst. Ebensowenig wie die mit Karbolfuchsin ge-

jenigen, welche in dem betreffenden Reagens die Farbe zwar abgeben, sich durch Karbolfuchsin aber wieder färben lassen. In den allermeisten Fällen werden die als gelöst bezeichneten Kugeln auch wirklich gelöst sein, obgleich es ja nicht unmöglich ist, daß nur das Färbevermögen und die Lichtbrechung in einzelnen Fällen durch das Reagens verändert worden wären. Im allgemeinen ist das Ausbleiben der Karbolfuchsinreaktion ein sichereres Kennzeichen für des Gelöstsein der Kugeln als das Auftreten einer schwächer lichtbrechenden Stelle allein am Ort der Volutanskugeln; denn es kann das Lichtbrechungsvermögen des die Kugeln umgebenden Cytoplasmas manchmal durch Reagentien, wie z. B. Jodjodkalium oder 1-proz. Säure so erhöht werden, daß die ungelösten Volutanskugeln in diesen Reagentien schwächer lichtbrechend erscheinen als jenes.

färbten Kugeln entfärben sich die mit Methylviolett, Methylenblau + Jodjodkalium, Fuchsin, Bismarckbraun und Anilinwassergentianaviolett + Jodjodkalium gefärbten Kugeln.

Chlornatrium, 10-proz., entfärbt die mit Methylenblau gefärbten Kugeln langsamer als die Alkalien. Sie behalten oft noch lange Zeit einen dunkelblauen, centralen Punkt. 1/4 Stunde mit dieser Lösung behandeltes Material zeigt nach Methylenblaufärbung die Kugeln wie sonst.

Eau de Javelle. Die mit Methylenblau gefärbten Kugeln entfärben sich sofort nach Zusatz dieses Reagens. Läßt man jedoch zunächst Eau de Javelle 5 Minuten auf das ungefärbte Präparat einwirken und färbt dann nach Abspülen mit Methylenblau, so treten die blauen Kugeln wie sonst auf, während das Plasma sehr unregelmäßig und schlecht sich färbt. Das Fett der Spirillen ist ebenfalls gut erhalten. Nach Zusatz von Natriumkarbonat verschwindet die Blaufärbung der Kugeln; sie lassen sich aber mit Karbolfuchsin wieder sichtbar machen.

Chloralhydrat. Nach 5 Minuten langem Verweilen in Chloralhydrat färben sich die Kugeln gut in Methylenblau. Die mit Methylenblau gefärbten Kugeln werden aber durch Chloralhydrat entfärbt.

Chlorzinkjod verhält sich ebenso.

Millons Reagens. Die ungefärbten Kugeln werden ohne Quellung sofort gelöst.

Formaldehyd fixiert die Kugeln derartig, daß sie trotz 3 Minuten langem Erhitzen unter Aufsteigen von Blasen in der Methylenblaulösung sich färben. Natriumkarbonat entfärbt jetzt auch noch, aber langsamer.

Alkohol. In 40-proz., 95-proz. Alkohol entfärben sich die Kugeln nicht, sie treten sogar besser hervor, da das Plasma der Stäbe verblaßt. In 96-proz. heißem entfärben sich die kleinen Kugeln nach und nach, die größeren werden kleiner, bleiben aber erhalten. Zusatz von Methylenblau läßt sie sofort alle wieder hervortreten. Aufeinander folgende Bäder in 10-proz., 40-proz., 80-proz. und absolutem Alkohol lösen die Kugeln ebensowenig, wie eine nachfolgende Behandlung mit Chloroform und Aether. Die unter Zusatz von Jodjodkaliumlösung zu den mit Methylenblau gefärbten Kugeln entstandenen schwarzen entfärben sich in absolutem Alkohol, werden nach Zusatz von Methylenblau aber wieder dunkelblau.

Karbolwasser, 5-proz., entfärbt allmählich die Kugeln, die dicksten zuletzt. Der Farbstoff diffundiert, wie man unter dem Mikroskop verfolgen kann, in das umgebende Protoplasma. Weiterer Zusatz von Methylenblau färbt sie wieder.

(Fortsetzung folgt.)

Ueber die Widerstandsfähigkeit der Pestbacillen gegen die Winterkälte in Tokyo.

[Aus dem Institute für Bakteriologie und Mikroskopie zu Tokyo.]

Von Dr. C. **Toyama**, Direktor im Institute.

Im allgemeinen können die Bakterienarten bekanntlich niedrigen Temperaturen leicht widerstehen. Bei mäßig kalter Temperatur und bei nicht zu lange anhaltender Kälte verfallen sie aber in eine Art Erstarrung und scheinen tot zu sein. Wenn sie aber wieder in eine entsprechende Temperatur gelangen, kommen sie zu neuem Leben, wachsen schnell und setzen ihre unheilvolle Thätigkeit fort.

Das Klima der gemäßigten Zone läßt die Bakterien selbst bei Wintertemperatur lange leben, obgleich diese öfters sehr tief fällt. Ueber die Widerstandsfähigkeit der verschiedenen Bakterien, über welche viele Verfasser schon geschrieben haben, will ich im Folgenden berichten.

Babes fand, daß der Choleravibrio leicht den Winter überstand, obgleich die Lufttemperatur bis zu — 40° sank. Uffelmann, Raptschewski und Wunke setzten eine Kultur der Vibrionen, welche hernach noch fortpflanzungsfähig war, während eines Monats der Wintertemperatur aus. Während ihrer Untersuchungen stieg die Temperatur nicht über — 12°, nur einmal sank sie bis zu — 32,5° und hielt sich 8 Tage lang bei — 25° bezw. — 30°. Kasansky untersuchte Cholerakulturen verschiedener Herkunft und verwandte Bakterienarten, die lebensfähig blieben, obgleich die Kulturen 20 Tage lang fest gefroren waren und auch mehrere Male wieder schmolzen. Dagegen behaupten Finkelnburg, Renk, Aber und Kasansky, daß die Vibrionen der Kälte gegenüber nur schwache Widerstandsfähigkeit besitzen. Allerdings gebe es Verschiedenheiten, je nach der Gattung der Vibrionen. Finkelnburg und Kasansky bewiesen, daß die über ein Jahr umgezüchteten Kulturen weniger konstant sind als frische, und daß die Widerstandsfähigkeit gegen Kälte auch nach den Nährsubstraten verschieden ist. Die Bakterien in Bouillon sind nämlich resistenter als die im Wasser; die im Kote vorhandenen Bakterien haben die geringste Widerstandsfähigkeit und gehen sehr schnell zu Grunde.

Aber suchte durch sehr sorgfältige Untersuchungen Näheres über das entsprechende Verhalten der Diphtheriebacillen zu erfahren. Getrocknete Kulturen standen während 2—3 Monaten im Winter im Freien, nicht geschützt gegen mehrmaliges Schmelzen und Wiederfrieren. Ihre Virulenz war geringer als diejenige der im Zimmer gezüchteten Kulturen.

Prudden fand, daß Eiterkokken 66 Tage lang im Eise lebten.

Die Erfahrungen Petruschky's über Streptokokken stimmten überein mit den Erfahrungen, welche Aber bei den Diphtheriebacillen gemacht hatte.

Als Nonewitsch die Widerstandsfähigkeit der Schweinerotlaufbacillen gegen Kälte untersuchte, fand er, daß die Pilze nicht abgestorben waren, nachdem sie einen Monat lang draußen in der Luft einer Temperatur von — 10—15° (R) ausgesetzt worden waren; auch waren sie noch virulent.

Galtier machte eine praktisch sehr interessante Untersuchung über Tuberkelbacillen. Er setzte sie 17 Tage lang am Tage einer Temperatur von + 10°, in jeder Nacht einer Kälte von — 7° aus und fand, daß die Bacillen trotz so vielmaligen Einfrierens und Wiederauftauens ihre Lebenskraft nicht einbüßten. Cadéac und Malet bewiesen, daß die Tuberkelbacillen ausgefrorener Lungenstücke noch nach 4 Monaten ihre Lebensfähigkeit bewahrten.

Kiepzoff fand, daß sporenfreie Milzbrandbacillen ihre Virulenz nicht verloren hatten, nachdem er sie 12 Tage lang einer Kälte von — 26,8° ausgesetzt hatte; er beobachtete aber, daß die Pilze immer weniger lebensfähig wurden und endlich starben, wenn man sie noch länger in derselben Kälte hielt.

Alle diese Untersuchungen beziehen sich auf die Winterkälte in der freien Natur. Ich will nun noch andere Untersuchungen anführen, welche mit künstlicher strengster Kälte gemacht wurden. Es sind folgende:

Schumacher setzte Hefepilze und Bacillenarten einer Temperatur von — 113° einige Augenblicke aus; sie verloren ihre Lebenskraft nicht. Frisch fand, daß verschiedene Bacillenarten, welche — 59° bezw. — 87,5° 1 Stunde lang ausgesetzt wurden, nicht starben. Pictet und Young machten entsprechende Untersuchungen über Milzbrandsporen, Heu-, Milzbrandbacillen und Hefe und stellten fest, daß die 2 ersteren bei — 130° 20 Stunden und bei — 70° 108 Stunden lang leben konnten; ihre Lebenskräfte wurden nicht geringer, die Milzbrandbacillen aber starben ab, während die Hefen dies nicht thaten, wohl aber ihr Gärungsvermögen einbüßten.

Im Jahre 1897—98 untersuchte N. W. Kasansky die Widerstandskraft der Pestbacillen (zugleich die der Diphtheriebacillen) gegen die Kälte in dem pathologisch-anatomischen Laboratorium der Universität zu Kasan. Da der Frost dieses Winters sehr streng war und länger andauerte, setzte er die Kulturen im Freien vor einem Fenster aus und machte 3 Versuchsreihen, nämlich 1) am 6. November (1897) mit 15 Bouillonkulturen, welche 2 Tage in dem Brütofen gehalten wurden, 2) am 9. Dezember mit 3 Agarkulturen, welche 7—10 Tage lang kultiviert waren, und 3) am 28. desselben Monats auch mit 7 Agarkulturen, welche 16—23 Tage lang kultiviert waren. Während 6 Monaten wurden von Zeit zu Zeit Proben entnommen und auf ihre Lebensfähigkeit geprüft.

Als Resultat ergab sich, daß die Pestbacillen gegen die Kälte im Winter eine außerordentlich große Widerstandsfähigkeit haben, obwohl die Kälte 6 Monate lang, vom November bis April, sehr streng war, und die Lufttemperatur vom 4.—28. November und vom 13. Februar bis 9. März höchstens — 10° bezw. — 23° betrug und selbst im Innern des Hauses bis zu — 14° bezw. — 33,8° herabsank. Hieraus schloß er, daß die Pestbacillen eine Temperatur von — 31° ertragen.

Ueber das Verhalten der Virulenz der Pestbacillen gegenüber der Kälte ist Folgendes bekannt: Wladimiroff und Kresling berichten, daß die Virulenz der Pestbacillen bedeutend geringer wird, wenn man die Kultur einer Temperatur von — 3° bis — 31° 6 Tage lang aussetzt. Kasansky impfte einer Maus 3 Platinösen von einer Kultur, welche er 5 Monate der Winterkälte von — 31° ausgesetzt hatte, ein. Die Maus starb nicht, wie gewöhnlich, nach einigen Tagen, sondern erst nach 14 Tagen. Er impfte die Emulsion der Milz von dieser verstorbenen Maus, 0,4 ccm (1:5), einer anderen Maus ein, welche nach

1 Monate gleichfalls starb. Verf. schließt daraus, daß die Virulenz der Pestbacillen sich abschwächt, wenn sie starkem Froste ausgesetzt sind.

Unter den Berichten der nach Indien abgesandten deutschen Kommission finden sich einige Untersuchungen, aus denen hervorgeht, daß die Pestbacillen eigentlich unter 30° besser wachsen, als bei Körpertemperatur. In einer Eiskammer, deren Temperatur sich zwischen 3,5—4° hielt und 5° nicht überstieg, wuchsen nach 20 Tagen Kolonieen, welche man makroskopisch sehr deutlich sehen konnte. Unter dem Mikroskop erwiesen sich diese Pestbacillen als von völlig typischer Gestalt.

Daß in Japan, welches in der gemäßigten Zone liegt, besonders in der Hauptstadt Tokyo, die Einwirkung der Kälte auch in der kältesten Zeit auf die Pestbacillen nicht bedeutend sei, sollte man annehmen. Ich wollte meine Untersuchungen während der Periode vom Januar bis zum März, der Zeit der strengsten Kälte in Tokyo, anstellen, doch wurde ich darin gestört, so daß ich nur die Monate Februar und März damit zubringen konnte.

Die Art und Weise meiner Untersuchungen war folgende: Im Frühling 1899 erhielt ich aus Osaka eine Originalkultur von Pestbacillen, deren Agarkultur ich 2 ganze Tage lang bei Körpertemperatur hielt. Als die Kultur makroskopisch deutlich erkennbar war, teilte ich sie in 2 Teile, deren einen ich mit einem Maximalminimalthermometer vor ein Fenster des Laboratoriums meines Institutes in Tokyo-Kembekyoin (in Tokyo-Kanda Ogawamachi I) setzte. Dieses Fenster befindet sich auf der Nordseite des Gebäudes und wird den ganzen Tag nicht von Sonnenstrahlen getroffen; vor demselben liegt ein viele Meter breiter Raum, so daß die Luftbewegung ungehindert ist. Die andere Hälfte hielt ich zum Vergleiche im Brütofen bei 37°. Auf diese Weise machte ich immer parallel mit jenen 2 Teilen mikroskopische, kulturelle Untersuchungen und Tierversuche. Die höchsten und die niedrigsten Temperaturgrade an allen Tagen in diesen beiden Monaten zeigt die folgende Uebersichtstabelle. Die niedrigsten Temperaturen auf dieser Tabelle findet man immer um 3 oder 4 Uhr vormittags und die höchsten meist am Nachmittage, zuweilen aber auch am Vormittage.

Nach dem 21. Februar stieg die Temperatur immer mehr und ich maß gewöhnlich nur einmal in der Woche die niedrigsten Grade, in der sicheren Annahme, daß die Temperatur des Nachmittags wärmer war, als die vor dem 20.

Aus der Tafel ist ersichtlich, daß in diesen 2 Monaten die höchste Temperatur zwischen + 3° und + 20° (am 31. März) und die niedrigste zwischen + 4,2° und — 2,5° (am 7. Februar) schwankte. Meine Untersuchungen während dieser 2 Monate hatten folgende Ergebnisse:

Die „Kolonieen“ außerhalb des Zimmers zeigten dem bloßen Auge in dem 1. Monate kein bedeutendes Wachstum, wogegen die in dem Brütofen recht gut gediehen.

In dem 2. Monate wuchsen dann aber auch die Kolonieen im Freien immer mehr und üppiger, so daß man keinen Unterschied zwischen diesen beiden mehr finden konnte, abgesehen davon, daß die im Brütofen mehr Bodensatz im Kondenswasser gebildet hatten.

Zum Studium der Lebensfähigkeit der Pestbacillen säete ich am 7., 13. und 21. Februar, 4. und 26. März und am 4. und 20. April, wie auf der Tabelle ersichtlich, auf Bouillon oder auf Agar aus, setzte die Kulturen in den Brütofen und beobachtete ihre Entwickelung.

Datum	1. II.	2. II.	3. II.	4. II.	5. II.	6. II.	7. II.	8. II.	9. II.	10. II.
Temper. am höchsten	+ 5,0°	+ 5,0°	+ 4,0°	+ 6,5°	+ 7,0°	+ 4,0°	+ 3,0°	+ 6,0°	+ 7,0°	+ 8,0°
Temper. a. niedrigsten	— 0,7°	0,0°	0,0°	+ 4,0°	+ 2,2°	0,0°	— 2,5°	— 1,0°	— 2,0°	+ 2,0°
Geschneit	ca. 20 cm auf die Erde									
Untersuchgn.							kultiv.			

Datum	11. II.	12. II.	13. II.	14. II.	15. II.	16. II.	17. II.	18. II.	19. II.	20. II.
Temper. am höchsten	+ 9,0°	+ 9,0°	+ 9,0°	+ 9,0°	+ 5,0°	+ 5,0°	+ 3,0°	+ 5,0°	+ 8,0°	+ 6,0°
Temper. a. niedrigsten	— 1,0°	— 1,5°	— 2,0°	— 1,0°	— 1,0°	— 2,0°	— 1,0°	— 1,0°	0,0°	0,0°
Geschneit					wenig		wenig gegraupelt	wenig gegraupelt		
Untersuchgn.				kultiv.						

Datum	21. II.	22. II.	23. II.	24. II.	25. II.	26. II.	27. II.	28. II.	1. III.	2. III.
Temper. am höchsten	+ 7,0°	+ 11,0°	+ 7,0°	+ 7,0°	+ 12,0°	+ 13,0°	+ 8,0°	+ 10,0°	+ 12,0°	+ 16,0°
Temper. a. niedrigsten			— 1,0°							+ 4,0°
Geschneit			wenig							
Untersuchungen	kultiv.									

Datum	3. III.	4. III.	5. III.	6. III.	7. III.	8. III.	9. III.	10. III.	11. III.	12. III.
Temper. am höchsten	+ 12,0°	+ 8,0°	+ 9,0°	+ 15,0°	+ 16,0°	+ 9,0°	+ 9,0°	+ 11,0°	+ 7,0°	+ 6,0°
Temper. a. niedrigsten							+ 1,0°			
Geschneit						wenig			wenig	
Untersuchungen		kultiv.								

Datum	13. III.	14. III.	15. III.	16. III.	17. III.	18. III.	19. III.	20. III.	21. III.	22. III.
Temper. am höchsten	+ 10,0°	+ 7,5°	+ 10,0°	+ 11,0°	+ 9,0°	+ 6,0°	+ 9,0°	+ 9,0°	+ 7,0°	+ 6,0°
Temper. a. niedrigsten				+ 2,0°						
Geschneit							wenig			
Untersuchungen										

Datum	23. III.	24. III.	25. III.	26. III.	27. III.	28. III.	29. III.	30. III.	31. III.
Temper. am höchsten	+ 10,0°	+ 7,0°	+ 15,0°	+ 12,0°	+ 7,0°	+ 10,0°	+ 12,0°	+ 12,0°	+ 20,0°
Temper. a. niedrigsten	+ 3,0°							+ 4,0°	
Geschneit									
Untersuchungen			kultiv.	Tierversuch					

Zuerst (im Februar) schien mir die Entwickelung der Bacillen im Freien etwas schwächer; dann (im März) fand ich keinen Unterschied mehr zwischen den Kulturen im Freien und in dem Brütofen; zuletzt (im April) aber wurde die Erscheinung ganz anders, und ich fand, daß die Entwickelungskraft und die Größe der Kolonie im Brütofen immer mehr abnahm als bei den Kulturen im Freien. Diese Erscheinung ist sehr leicht verständlich, da im allgemeinen die Lebenskraft der Bakterien in der Probierröhre nach einer gewissen Zeit von selbst geringer wird oder sich selbst vernichtet, weil sie durch das von ihnen selbst erzeugte Gift beeinflußt werden, und zwar um so stärker, je rascher die Entwickelung vor sich geht.

Die Thatsache, daß am Anfange die Kultur im Freien langsamer wuchs, möchte ich dahin deuten, daß die Lebenskraft der Bakterien unter der Wirkung der strengen Kälte mehr oder weniger abgenommen hatte.

Bei mikroskopischer Prüfung zeigte sich die „Morphologie“ der Kultur im Freien unverändert. Dagegen fand ich im Brütofen nach 1 Monate das Auftreten der verschiedenen, den Pestbacillen eigenen Involutionsformen, die sich nach 2 Monaten immer mehr vermehrten.

Was nun die „Virulenz“ der Kulturen anbetrifft, so impfte ich am 26. März aus der Kultur im Freien 3 Platinösen in die Unterhaut zweier Mäuse und zugleich in derselben Weise auch aus der Brütofenkultur (am 56. Tage nach der Aussaat) 2 andere Mäuse. Die 2 ersteren starben bis zu 30 Stunden; die eine von der 2. Serie fand nach 4 Tagen ihren Tod und die andere blieb am Leben. Auch am 23. April impfte ich von neuem aus der Kultur im Freien und zugleich aus der im Brütofen gehaltenen Kultur (am 84. Tage nach der Aussaat) je 2 Mäuse mit je 3 Platinösen subkutan. Die eine Maus der ersteren Reihe starb in der Nacht des 24. April (in der 30. Stunde nach der Impfung) und die zweite am Mittage des 26. April (in der 67. Stunde nach der Impfung). Dagegen starben die 2 Mäuse, die von der Brütschrankkultur geimpft wurden, erst am 29. dieses Monats (am 6. Tage nach der Impfung).

Meine Resultate sind demnach, kurz gesagt, die folgenden:

1) Obgleich die Pestbacillen der Winterkälte (niedrigste Temperatur $-2{,}5^{0}$) in Tokyo ausgesetzt waren, wurde ihre „Lebensfähigkeit und ihre Virulenz“ nicht verringert, sondern erhielt sich im Gegenteil besser, als in der Brütwärme.

2) Während die Virulenz der Kultur der Pestbacillen in der Winterkälte (der höchsten Temperatur $+20^{0}$) nach fast 3 Monaten fast unverändert war, zeigten die in der Brütwärme gewachsenen Kulturen nach 56 Tagen eine bedeutende Abnahme der Virulenz und nach 84 Tagen noch mehr.

3) Anfänglich zeigte die Kultur der Pestbacillen in der Winterkälte eine etwas geringere „Fortpflanzungsfähigkeit“, doch verwischte sich dieser Unterschied später und nach 3 Monaten war die Wachstumsgeschwindigkeit der kalt gehaltenen Kulturen sogar größer als die der bei Brütwärme gehaltenen.

4) Die Kultur der Pestbacillen in der Winterkälte neigte weniger zur Bildung von Involutionsformen, als die in der Brütwärme gewachsene Kultur.

Nachdruck verboten.

The composition of the tubercle bacilli derived from various animals.

[Biochemic Laboratory, B. A. I., Dept. of Agriculture, Washington [1]).]

By **E. A. de Schweinitz,** Ph. D., M. D. and **M. Dorset,** M. D.,

The preliminary work of Hammerschlag (1) upon the substances contained in the bodies of the tubercle bacilli, which could be extracted with ether and alcohol, and the probable composition of the extracts so abtained, furnished considerable material for speculation. Nothing further was done in this line, however, until the writers, de Schweinitz and Dorset (2), reported investigations which they had made confirming the work of Hammerschlag and indicating the presence of a large percentage of ether and alcohol soluble material in the tubercle bacilli. We also found in these extracts volatile fatty acids and other acids, attempts to determine the character of which, however, were made only by the melting points. We called attention to the large percentage of phosphoric acid present in the ash of the tubercle bacilli and to the fact that this was the only acid found. This indicated that there was probably a large percentage of lecithin or nucleo-proteids in the germ cells. The presence of the former substance had been noted previously by Hammerschlag. We also called attention to the fact that the peculiar staining properties of the tubercle bacilli were probably due to the large amount of fatty material which they contain. Klebs (3) found considerable fatty material in the tubercle bacilli. Weyl (4) reported that the fatty extract from the tubercle bacilli was just as tenacious in holding the aniline dyes as was the tubercle bacillus itself. Ruppel (5) claims to have isolated three sorts of fatty substances. Aronson (6), several years after de Schweinitz and Dorset had published the work above referred to, reported the chemical examination of the tubercle bacilli which he had made. He failed to note the work done by the above, named authors. In his article he claims that a very large amount of extractive material is free fatty acid, which point, however, is not thoroughly confirmed by our own work. Levene (7) records the results he obtained by extracting tubercle bacilli with ether and alcohol.

The writers of this article have extended their studies in the examination of the composition of the tubercle bacilli to the following: 1) An attenuated bacillus of human origin obtained originally through the courtesy of Dr. E. L. Trudeau, which had been derived from a man and passed through a guinea pig. This had been grown upon artificial media for about 160 generations. Although originally virulent for small animals it had entirely lost its pathogenic properties for guinea pigs. 2) A virulent bacillus of human origin obtained also from man, which had subsequently been grown for 50 generations upon artificial media. This germ still retains its virulence and will cause the death of guinea pigs in 5 to 6 weeks, after subcutaneous injection of a small amount. 3) A virulent bovine bacillus obtained originally from Dr. Theobald

1) Published through the courtesy of Dr. D. E. Salmon, Chief of Bureau of Animal Industry.

Smith, which was still virulent for small animals as well as for cattle. 4) A virulent swine bacillus, obtained also through the kindness of Dr. Theobald Smith, virulent for small animals, 5) A tuberculosis germ from the horse, obtained from Dr. Ravenel, of Philadelphia, and regarded by him as originally of bovine origin, as the conditions indicated that the horse had contracted the disease from cattle, and, 6) An avian germ, the original culture of which was also obtained from Dr. Ravenel. The bovine, swine, horse and avian germs had also been grown upon artificial media for several years, without passing them through an animal. In order to obtain a quantity of material sufficently large to permit of the chemical analyses recorded below, it was necessary to grow these various germs in quantity, and in order to make the analyses comparative, a uniform medium was used. Its preparation and composition can be seen from the following record taken from the laboratory book in which notes are made, of each lot of culture media prepared: Chopped meat, 1 part, distilled water, 2 parts, heated at 45° to 60° C for three hours, strained, boiled, filtered, one per cent peptone and $^1/_2$ % acid potassium phosphate added. Neutralized with sodium hydrate; boiled one hour; 7 % glycerine added, filtered; acidity, = about 10 ccm $\frac{N}{10}$ sodium hydrate required to neutralize 100 ccm beef broth, phenolphthalein being used as an indicator. It will be noted that this medium differs from the ordinary broth used for the tubercle bacillus by the substitution of acid potassium phosphate for sodium chloride, and further that the medium is left with an acid reaction.

In bulletin No. 13 of the Bureau of Animal Industry, 1896. the writers reported a study of the growth of the tuberculosis bacillus upon acid media, and called attention to the fact that the acid reaction of the media appears to be advantageous for the development of the tuberculosis germ. Subsequently it was noticed that the addition of acid phosphate of potassium and the omission of sodium chloride gave a liquid upon which the germs would develop very much more rapidly than upon the ordinary medium containing sodium chloride. This substitution of acid potassium phosphate was naturally suggested by the study of the composition of the ash of the tubercle bacilli already referred to and published in 1898. In fact, for a number of years, tuberculosis cultures of various sorts grown in this laboratory have been made upon media containing the phosphate. The results have been eminently satisfactory not only in securing a rapidity of growth but also apparently in keeping up the virulence of the germs. This is a point of considerable practical importance to which attention has not been previously called.

The cultures of the several tubercle bacilli made upon the medium above described, were from two to four months old, and had been grown at a temperature of from 37—38° C. The cultures of the different germs were poured into perfectly clean, sterile flasks and heated for a few minutes to the boiling point. The bacilli were then allowed to settle and first washed by decantation (with hot water), then transferred to a folded filter and washed again with hot water so long as a reaction for phosphates was noted when the filtrate was tested with nitrate of silver. This same process was adopted also, for all the different cultures, the greatest care being used to avoid contamination with any foreign matter. The moist germs were carefully removed by means of

a spatula, from the filter paper, and dried over sulphuric acid. They were then powdered into bits about the size of very small bird shot and dried to a constant weight at 60° C in an oven with a vacuum of 26 inches. These dried bacilli served as a starting point for the extractions. They were extracted first with hot ether, then with hot alcohol and then with hot chloroform, Knorr's extraction apparatus being used. In each case the extraction was continued so long as any material was dissolved out and the germ most was again dried to a constant weight before proceeding to use the next solvent. The time occupied in this operation with the different solvents was from 4 to 5 days each. The quantity of material extracted was determined by loss of weight, the germs used being first weighed in the tube and again after the different extractions had been completed. The error resulting from manipulation, therefore, was the minimum. The following table I, shows the results of duplicate determinations of the ether, alcohol and chloroform extracts of the six different germs used.

Table I.

Ether, alcohol and chloroform extracts of tubercle bacilli.

	Bovine bacilli			Swine bacilli			Horse bacilli		
	1. %	2. %	Average %	1. %	2. %	Average %	1. %	2. %	Average %
Ether extract	17,74	17,66	17,70	13,69	11,43	12,56	22,90	23,87	23,38
Alcohol extract		8,13	8,13		7,83	7,83	8,18	8,18	8,18
Chloroform extract		0,49	0,49		0,20	0,20	·0,29	0,12	0,20
Total Extracts		26,28	26,32		19,46	20,59	31,37	32,17	31,76

	Avian bacilli			Attenuated human bacilli			Virulent human bacilli		
	1. %	2. %	Average %	1. %	2. %	Average %	1. %	2. %	Average %
Ether extract	17,40	17,32	17,36	28,86	28,59	28,72	20,40	20,22	20,31
Alcohol extract	13,15	13,39	13,27	7,22	7,49	7,36	7,21	7,23	7,22
Chloroform extract	0,04	0,00	0,02	1,33	(1,33)	1,33	0,48	(0,48)	0,48
Total extracts	30,59	30,71	30,65	37,41	37,41	37,41	28,09	27,93	28,03

It will be noted that by far the highest percentage of ether extract is obtained from the attenuated human bacilli, and from the others in the following order: Horse bacilli, virulent human bacilli, bovine bacilli, avian bacilli and swine bacilli. The percentages of the ether extract obtained from the avian and bovine germs are very near each other. When we consider the alcohol extract the order is different. The highest percentage of alcohol extract is found in the avian bacilli, and the others in the following order: Horse, bovine, swine and human bacilli, there being but little difference between the quantity of alcohol extract in the two varieties of human bacilli. The chloroform extract was hardly worth consideration, except in the case of the attenuated human bacilli and in the case of the virulent human bacilli and the bovine bacilli. In the latter the percentages of chloroform extract appeared to be about the same. In the consideration of the totals of these various extracts we find the following order: The highest percentage in the attenuated human, the horse, avian, virulent human, bovine and swine,

following in the order named, as can be seen in table I. This high percentage of total extractive matter agrees fairly well with the percentage noted in our original work upon the human bacilli already referred to, reported in 1895.

In a recent article Kresling (8) reviews the work of the various authors upon the examination of the tubercle bacilli of human origin. He varied the order of the solvents used, but found that the total extractive material was in all cases approximately the same. The bacilli which he used had been collected during a number of years, from 1893—1897, and the medium upon which it was cultivated was the ordinary glycerine beef broth containing salt and peptone, the medium having, when inoculated, an acid reaction of not over $^4/_{10}$ of a ccm of $\frac{N}{10}$NaOH to 100 ccm of the bouillon. This is a smaller amount of acid than that present in our tuberculosis culture media.

Following the earlier work we have also had ash determinations made of the various germs that were used for extractions and the determination of the phosphoric acid present in the ash. These analyses were kindly made by Mr. James A. Emery of this laboratory. As the material used for these determinations had all been grown upon the same sort of media, washed in the same way with approximately the same amount of water, it is fair to presume that the percentage of ash represents approximately, if not absolutely, the ash which would result from a destruction of the organic matter of the germs. Sulphuric acid and chlorides were not found present, so that the percentage of phosphoric acid while higher in the human bacilli, than in the others, is apparently a constant one.

Table II.
Ash and phosphorus in tubercle bacilli.
(Determinations made by J. A. Emery.)

	Moisture		Ash		P_2O_5 in dry bacilli		P_2O_5 in ash	
	1. %	2. %	1. %	2. %	1. %	2. %	1. %	2. %
Bovine bacilli	2,42	2,48	2,66	2,67	1,56	1,55	58,54	58,04
Swine bacilli	2,26	2,06	2,37	2,31	1.30	1,31	55,00	56,48
Horse bacilli	2,27	2,42	3,63	3,55	2,07	2,02	55,68	55,40
Avian bacilli	2,40		3,96	3,94	2,22	2,19	55,98	55,63
Human bac. (atten.)	2,67	2,58	2,44	2,31	1,79	1,71	73,49	74,38
Human bac. (virul.)	3.91	3,70	3,94	3,92	2,50	2,38	63,47	60,90

In our earlier article upon the mineral constituents of the tubercle bacilli, published in 1898, the percentage of phosphoric pentoxid was found to be a little over 55 in the human germ. As will be noted from table II, the percentage of phosphoric pentoxid in these human germs was found to be, in the virulent, over 60 %, in the attenuated, over 70 %. In comparing these figures with the earlier results, it should be remembered that the germs used for obtaining the earlier data were grown upon the ordinary glycerine media to which no phosphates had been added, while all of the present germs were grown upon a medium rich in phosphates. The amount of material available for the phosphoric pentoxid determinations here reported was also small, so that there may be some slight error due to manipulation, but allowing for these

facts, it is very evident that all of these tubercle bacilli are voracious consumers of phosphoric oxid, in which property they correspond to a great many other plants. Levene (9) reports an analysis of human tubercle bacilli grown upon the ordinary beef broth and manite synthetic media. In these he found a considerable variation, both in the percentage of extractive material and in the percentage of ash obtained from the germs. His percentage of ash was in all instances higher than that which the writers of this article reported in 1895. In that work we used cultures grown on beef broth and also on our synthetic medium (10).

Aronson's assumption that the extractive matter of the tubercle bacilli was very largely fatty acids, a conclusion which does not follow from the methods that he has reported in his article, led us to make some preliminary determinations of the possible free acid present in our various extracts. Kresling concluded that the chloroform extract of the human tubercle bacilli contains about 14 % of free fatty acid. Our determinations of the possible free fatty acid were based upon the acid value as secured by titration with $\frac{N}{10}$ sodium hydrate. The results are recorded in Table III.

Table III.
Acid value of ether and alcohol extracts of tubercle bacilli.

	Acid value		Total acid value calculated on the sum of the ether and alcohol extr.	free acids in alcohol and ether extracts	
	Ether extract	Alcohol extract		Ether extracts %	Alcohol extracts %
Bovine bacilli	9,43	20,40	12,90	4,74	10,25
Swine bacilli	8,02	23,45	13,97	4,03	11,78
Horse bacilli	9,36	18,47	11,46	4,70	9,28
Avian bacilli	13,00	13,11	13,04	6,53	6,59
Human bac. (atten.)	12,77	14,57	13,13	6,41	7,32
Human bac. (virul.)	14,02	16,45	14,63	7,04	8,26

	Per centage of free acids calculated on the ether and alcohol extracts combined	Free acids calculated for whole substances		Total percentage free acids in bacilli
	%	Ether extracts %	Alcohol extracts %	%
Bovine bacilli	6,48	0,83	0,83	1,66
Swine bacilli	7,02	0,46	0,92	1,38
Horse bacilli	5,76	1,09	0,75	1,84
Avian bacilli	6,55	1,13	0,87	2,00
Human bac. (atten.)	6,60	1,84	0,53	2,37
Human bac. (virul.)	7,35	1,42	0,85	2,01

The tree acids were calculated from the acid value and were considered as oleic acid.

The acid value was determined both in the ether and alcohol extract separately. The total acid value which can be noted in table III, shows that the highest acid value was obtained from the virulent human and the others in the following order: Swine, attenuated human and avian, bovine and horse. In the last column are given the total percentages of the free acids in the whole germ counted as oleic acid.

The acids were all calculated as oleic for the purpose of making a satisfactory basis for comparison.

Until we have completed the determinations of the exact character of the ether, alcohol and chloroform extracts obtained from these various bacilli, which is in progress at the present, much speculation in regard to the relation of the composition of the germ to its character and virulence is not warranted. It is interesting to note that the percentage of alcohol extract obtained from the avian bacilli is very much greater than that obtained from any of the other germs. While the percentage of chloroform extract in the bovine bacilli and virulent human bacilli is almost exactly the same, there being but little chloroform extract obtained from the horse, swine and avian germs, while a considerably larger amount is secured from attenuated human germs. The variation in the amount of ether extract is also noticeable, the human attenuated germ showing again a very much greater percentage. The results certainly indicate that as there is a variation in the morphology of the tubercle bacilli derived from different sources, depending upon their surroundings, so there is a variation in the composition of the body of the germs themselves. They show, further, a point which should be especially emphasized, that there is a greater difference between the two human germs, the one attenuated, non-pathogenic for guinea pigs, the other almost as pathogenic for guinea pigs as the bovine germ, than there is between the virulent human and the bovine and horse bacilli. It is certainly not an unwarranted assumption that possibly this loss of virulence in the human germ is due to the fact that the germ has acquired through its prolonged saprophytic existence and its consequent immunity from the attacks of phagocytes and other protective substances in the animal body, the property of producing smaller amounts of poisonous substances, while in the case of the virulent germ, the bovine, horse and swine germs, which do not produce nearly so large an amount of harmful fatty substances, and consequently contain a lower percentage of extractive matter, the relative amount of poisonous proteid produced is greater. That this proteid matter belonging to the class of nucleo-proteids, as was already pointed out by the writers in 1895, in the article above referred to, is one of the principal poisons of the tubercle bacilli, has been well demonstrated, and if the bacilli are able to produce larger amounts of these poisonous substances, it would necessarily follow that they are much more virulent. A further study of this proteid substance is in progress as well as the identification of the free fatty acids, fats, waxes, and other extractive material.

It must be remembered, of course, that all of the germs used for these anlyses were washed with hot water, and all water soluble material had been extracted before the analyses were made. As pointed out by the writers in 1897 (11), there is present in the cultures of the human bacilli a very virulent acid-like necrotic substance readily soluble in water. This substance, as well as those of a similar nature, were necessarily extracted in the preparation of the germs for analysis, and hence do not come into consideration in this report.

Our results here recorded, indicate the relationship between the tubercle bacilli derived from various sources and emphasize the differences between attenuated and virulent human tubercle bacilli. It must be remembered that these analyses were made only upon one represen-

tative of each of the different bacilli, yet the results in the human germs correspond so closely with those obtained in 1895 and also those reported by other workers that we can assume a like composition for the bacilli obtained from similar sources.

Bibliography.

1) Hammerschlag, Centralbl. f. klin. Med. Bd. XII. p. 9—18.
2) de Schweinitz and Dorset, Journ. Amer. Chem. Soc. 1895. Aug. — Centralbl. f. Bakt. etc. 1896. No. 18 u. 19. — Journ. Amer. Chem. Soc. 1898. Aug.
3) Klebs, Centralbl. f. Bakt. etc. I. Abt. Bd. XX. p. 488.
4) Weyl, Deutsche med. Wochenschr. 1891. No. 7.
5) Ruppel, Zeitschr. f. phys. Chemie. Bd. XXVI. p. 218.
6) Aronson, Berl. klin. Wochenschr. 1899. p. 484.
7) Levene, Journ. of Med. Research. 1901. July.
8) Kresling, Centralbl. f. Bakt. etc. I. Abt. Bd. XXX. 1901. Dec. 28.
9) Levene, Journ. of Med. Research. 1901. July.
10) de Schweinitz, Med. News. 1894. December.
11) de Schweinitz and Dorset, Centralbl. f. Bakt. etc. I. Abt. Bd. XXII. 1897. p. 209.

Ueber eine neue Bakterienart im Sputum.

von Dr. **Ludwig Jehle**,
gew. Prosekturadjunkt am Kaiser Franz Josef-Spital in Wien.

Mit einer Dreifarbentafel.

Gelegentlich der bakteriologischen Sputumuntersuchungen beobachten wir im Laufe der letzten 2 Jahre in einer größeren Anzahl von Fällen eine Bakterienart, welche mit keiner bisher bekannten identifiziert werden kann. Dieselbe ist morphologisch besonders interessant und soll in der vorliegenden Arbeit beschrieben werden.

Von den bisher beobachteten 30 verschiedenen Fällen (ca. 1 Proz. der untersuchten Sputumproben) soll nur bei 3 Fällen ein kurzer Auszug der Krankengeschichte wiedergegeben werden.

I. Patient W. A., vorher stets gesund, erkrankte einige Tage vor seiner Spitalsaufnahme plötzlich unter Fieber und starkem Husten. Bei der Aufnahme ließ sich eine rechtsseitige Lobärpneumonie nachweisen. Im weiteren Verlaufe der Erkrankung kam es zu einer ausgebreiteten Abscedierung des infiltrierten Lungenlappens. Das Sputum, welches im Beginne rubiginös war, wurde später eiterig und in großen Massen exspektoriert. — Das Krankheitsbild war vom Beginne an durch eine auffallend starke Dyspnoë und Cyanose ausgezeichnet. Bei der mikroskopischen Untersuchung des Sputums fanden sich neben Influenza- und Friedländer-Bacillen ziemlich plumpe Diplokokken in großer Menge vor. Kulturen wurden in verschiedenen Zeitintervallen 5-mal angelegt. Bei den ersten 3 Untersuchungen fanden wir neben Influenza und Friedländer-Kolonieen zahlreiche große, helle, deutlich irisierende Kolonieen.

II. Patient S. J. soll schon seit längerer Zeit an Husten gelitten haben. Bei der Aufnahme war eine nur mäßig fortgeschrittene beiderseitige Spitzeninfiltration nachzuweisen. Trotz dieses geringen objektiven Befundes traten anfallsweise so heftige Attaquen von Dyspnoë und Cyanose auf, daß wiederholt der Verdacht einer akuten und miliaren Tuberkulose auftauchte. Doch erholte er sich von diesen Anfällen

immer wieder ziemlich rasch und konnte nach einem längeren Spitalsaufenthalte endlich gebessert entlassen werden. Nach kurzer Zeit jedoch mußte er, da sich sein Zustand wesentlich verschlimmert hatte, neuerdings aufgenommen werden. Das Sputum, welches meist einen eiterigen Charakter hatte und nur einige Male die Spuren einer Blutbeimengung zeigte, wurde im ganzen 9-mal bakteriologisch untersucht. Mikroskopisch fanden sich in demselben neben sehr spärlichen Tuberkelbacillen zahlreiche, ziemlich plumpe Diplokokken vor. In den Kulturen wurden regelmäßig neben spärlichen Influenzakolonieen zahlreiche helle, irisierende Kolonieen, gleich denen im Fall I, vorgefunden.

III. Bei Patienten N. J. war eine nur mäßig fortgeschrittene Spitzentuberkulose nachzuweisen. Das Sputum wurde dreimal bakteriologisch untersucht und jedesmal wurden die eigentümlichen Kolonieen in großer Menge vorgefunden. — Patient verließ nach einem längeren Aufenthalt das Spital, wurde jedoch nach 3 Monaten neuerdings aufgenommen. Nach seinen Angaben verschlimmerte sich sein Zustand in den letzten Tagen plötzlich. Bei der Aufnahme fiel eine außerordentlich heftige Dyspnoë und Cyanose auf. Bei der Untersuchung der Brustorgane konnte neben einer mäßigen Spitzeninfiltration eine linksseitige Unterlappenpneumonie nachgewiesen werden. Das Sputum war schleimig, eiterig und stark rubiginös gestriemt. Da der Tod schon nach einigen Stunden eintrat, wurde dasselbe in vivo nicht mehr untersucht. Die Obduktion bestätigte den klinischen Befund. Im Bronchialeiter, sowie im pneumonischen Exsudate fanden sich ziemlich plumpe Diplokokken vor. In der Kultur waren ausschließlich die irisierenden Kolonieen gewachsen.

In den übrigen Fällen waren die verschiedenartigsten Lungenaffektionen vertreten (Tuberkulose, Lungengangrän, Pneumonie, Bronchitis, Typhusbronchitis). Auch unter diesen war eine größere Anzahl durch eine auffallend heftige, meist anfallsweise auftretende Dyspnoë und Cyanose ausgezeichnet, welche durch den klinisch nachweisbaren geringen Lungenbefund oft nicht erklärt werden konnten. Die eigentümlichen Kolonieen wurden auch in diesen Fällen teils einmal, teils wiederholt in Reinkultur oder mit anderen Bakterien vermengt (meist Influenza oder Pneumonieerreger) vorgefunden.

Im Sputum (mit verdünntem Karbolfuchsin gefärbt) fanden wir in allen Fällen ziemlich plumpe Diplokokken, deren Größe im übrigen stark variierte. Stets waren sie jedoch größer und plumper als der Diplococcus pneumoniae. Auch die Länge der einzelnen Glieder war sehr wechselnd, indem sie einmal fast rund erschienen, ein andermal einen größeren Längendurchmesser besaßen und dann die Form der Diplobacillen annahmen. Sie waren mit allen Farbstoffen leicht färbbar und tingierten sich meist gleichmäßig. Nach Gram entfärbten sie sich ziemlich leicht. Eine Kapsel konnte niemals gefärbt werden, ebensowenig jene eigentümlichen Formen, welche bei der Ueberimpfung des Sputums auf feste Nährböden nahezu die Regel bildeten. (Siehe Abbildung I.)

Das ganz merkwürdige morphologische Verhalten der Bakterienart möge die folgende Beschreibung, sowie die beigefügten Abbildungen veranschaulichen:

Die Kulturversuche wurden in der üblichen Weise ausgeführt. Das Sputum wurde nach vorhergegangener Reinigung der Mundhöhle in sterilen Petri'schen Schalen aufgefangen und in möglichst frischem Zustande untersucht. Zuerst wurde eine mikroskopische Untersuchung

vorgenommen und dazu fast ausschließlich die Färbung mit verdünntem Karbolfuchsin verwendet. Zur Kultur wurde ein geeignetes Sputumpartikelchen mit sterilem Pferdeblut verrieben und ein Teil dieses Gemenges auf der Oberfläche einer schwach alkalisch reagierenden Agarplatte gleichmäßig aufgestrichen. Die so beschickten Platten wurden durch 24 Stunden einer Bruttemperatur ausgesetzt. Nach Ablauf dieser Zeit waren die Kulturen durch ihr deutliches Irisieren schon makroskopisch leicht zu erkennen.

Auf der Originalplatte (mit Blutzusatz) zeigten sich nach dieser Zeit ziemlich große (etwa $^2/_8$ der Größe gleichalteriger Friedländer-Kolonieen), milchig durchscheinende, etwas gewölbte, scharfrandige Kolonieen, bei welchen vor allem ein leichter Perlmutterglanz und ein schönes Irisieren auffällt, indem sie bei einer leichten Verschiebung der Agarplatte gegen die Lichtquelle einen den Newton'schen Ringen ähnlichen Farbenschiller zeigen. Bei einer schwachen Vergrößerung erscheinen die Kolonieen von bräunlicher Farbe, sehr fein granuliert, mit einem im Centrum gelegenen dunkleren Kern, um welchen manchmal konzentrisch geordnete zarte Ringe zu sehen sind, die durch etwas breitere helle Zonen voneinander getrennt werden. Außerdem durchziehen die einzelnen Kolonieen mitunter noch etwa 4—6 radiär gestellte, gegen das Centrum breite, gegen den Rand sehr zart auslaufende dunkle Streifen. Bei konfluierenden Kolonieen ist die vereinigende Brücke meist dunkler gestreift.

Schon nach weiteren 24 Stunden hat sich das Aussehen der Kolonieen wesentlich verändert. Sie werden größer, flacher, weniger durchsichtig, ihr Rand weniger scharf, oft leicht gelappt, das Irisieren ist fast vollständig geschwunden. Bei schwacher Vergrößerung erscheinen sie dann gleichmäßig bräunlich, umgeben von einer hellen äußeren Zone, welche etwa $^1/_8$ des Gesamtdurchmessers der Kolonie beträgt. Ein Geruch wurde weder an frischen noch an älteren Kulturen bemerkt. Beim Abimpfen zeigen besonders die frischen Kulturen eine den Friedländer-Kolonieen ähnliche zähschleimige Konsistenz.

Durch die Ueberimpfung auf die verschiedenartigsten Nährböden ließen sich folgende Eigenschaften ermitteln:

1) Temperatur. Bei Zimmertemperatur (17,0—19,0° C) konnten frische Stämme auf keinem der üblichen Nährböden gezüchtet werden; erst ältere und öfter überimpfte Stämme zeigten auf Agarnährboden sowie in Bouillon ein sehr spärliches Fortkommen. Am besten gedieh das Bakterium bei einer konstanten Temperatur von 37,0—38,0° C.

2) Nährböden. Auf sterilem Mehlkleister, sowie auf Kartoffel war kein Wachstum zu beobachten.

Auf 10-proz. Gelatine war gleichfalls nie ein Wachstum zu erzielen.

In schwach alkalische Bouillon überimpft, erschien dieselbe nach 24 Std. (bei Bruttemperatur) leicht getrübt; bei einem weiteren Verweilen im Thermostaten nahm die Trübung nur langsam zu. Nach 6—8 Tagen war am Boden der Eprouvette ein spärlicher körniger Niederschlag zu beobachten. Durch wiederholte Versuche konnte jedoch festgestellt werden, daß bei einzelnen der zur Beobachtung gelangten Stämme trotz aller Vorsicht die Züchtung in Bouillon ohne Blutzusatz regelmäßig mißlang und erst durch einen geringen Hämoglobinzusatz erzielt werden konnte.

Auf schwach alkalischen Agarnährböden ließ sich ein Wachstum bei den meisten frischen Stämmen nicht beobachten. Dagegen war dasselbe

bei Blutzusatz zu den Nährböden (besonders in der von Voges angegebenen Modifikation) ein besonders üppiges und charakteristisches. — In den Strichkulturen zeigten sich die oben beschriebenen großen irisierenden Kolonieen; in Stichkulturen war entlang dem Stichkanal ein zarter Streifen, der an der Agaroberfläche mit einer erhabenen, etwas gelappten Oberflächenkolonie endete, sichtbar.

Auf neutralem Agar (Lackmusreaktion) gediehen auch frische Stämme ohne Blutzusatz besser, als auf der gewöhnlich alkalischen, sowohl in Strich- als auch in Stichkultur, und zeigten in ersterer ein besonders schönes Farbenspiel und Glanz.

Auf Löffler'schen Nährböden war das Wachstum ein üppiges, die saftigen Kolonieen von gleichem Aussehen, wie auf Agarnährböden und konfluierten auf diesen Nährböden besonders leicht.

Auf Traubenzuckeragar ohne Blutzusatz kein Wachstum, auch auf Blutzusatz war dasselbe nur sehr gering, die Kolonieen waren klein, von einem mehr trockenen Aussehen.

Auf Glycerinagar wurden ähnliche Kolonieen wie auf Traubenzuckeragar beobachtet.

Auf Blutserumagar (Pferdeserum) dagegen war das Wachstum ein sehr üppiges. Die Kolonieen waren, ähnlich wie auf den Löffler'schen Nährböden, groß und saftig und zeigten ein sehr schönes Farbenspiel.

Resistenz. Gegen den Einfluß höherer Temperaturen erwiesen sich die Bakterien als ziemlich empfindlich. Durch 5 Minuten einer Temperatur von 45° C ausgesetzt, waren sie kaum noch weiter zu züchten. Durch Erhitzen auf 50° C gingen sie in derselben Zeit sicher zu Grunde. Auch gegen Austrocknung sind sie nur wenig resistent. Mit kleinen Mengen Bouillon verrieben, waren sie nach einer 24 Std. dauernden Austrocknung (gegen Licht geschützt), mit Blut verrieben überimpfbar; dagegen nach 48 Std. nicht mehr. Auch bei der gebräuchlichen Art des Weiterzüchtens auf schräg erstarrten Nährböden, sowie auf Agarplatten gehen sie sehr häufig nach 5—8 Tagen infolge des Feuchtigkeitsverlustes des Nährbodens zu Grunde, erhalten sich jedoch bedeutend länger, wenn man das Verdunsten des Kondenswassers durch einen Kappenverschluß verhindert. Aus demselben Grunde ist die Haltbarkeit der Kulturen im Stich, sowie insbesondere in Bouillon eine viel größere.

Die mikroskopische Untersuchung der Reinkulturen zeigte in vieler Hinsicht interessante Befunde. — Die Bakterien wiesen nicht bloß auf den ersten Blick eine ganz besondere Vielgestaltigkeit auf, sondern zeigten auch bei der Ueberimpfung auf verschiedene Nährböden einen so auffallenden Formenwechsel, daß eine eingehendere Beschreibung notwendig erscheint.

Schon in den ganz frischen Kulturen fiel ein besonderer Polymorphismus der Bakterien auf. — Es möge sofort bemerkt werden, daß sich in dieser Hinsicht die einzelnen beobachteten Stämme, ja sogar verschiedene Kulturanlagen desselben Stammes qualitativ und quantitativ (was das Ueberwiegen der einen oder anderen der zu beschreibenden Formen anbelangt) sehr verschieden verhalten haben. — Ueberwiegend finden sich lange, unbewegliche, teils gegliederte, teils ungegliederte, vielfach gekrümmte Fäden, welche den Scheinfäden der Influenza sehr ähnlich sehen, jedoch bedeutend dicker als letztere sind. Daneben sind einzelne gleichfalls unbewegliche kurze Stäbchen sichtbar, die entweder einzeln lagern, oder zu zweien aneinander gereiht

sind. Ihre Länge variiert sehr, sie können mitunter so kurz sein, daß ihr Längs- den Breitendurchmesser kaum übertrifft und sie infolgedessen die Form von Kokken, resp. Diplokokken annehmen. Stets sind sie jedoch plumper als Influenza — und schlanker als der Friedländersche Pneumobacillus. Eine Kapsel konnte durch keine Färbung mit Sicherheit nachgewiesen werden.

An den langen Scheinfäden wurde wiederholt eine echte Teilung beobachtet, insbesondere in ganz frischen, langsam wachsenden Agarkulturen, welche bei niedrigeren Temperaturen erzielt wurden.

Das eigentümlichste Bild jedoch zeigen folgende, gleichzeitig mit den oben beschriebenen, in frischen Kulturen häufig beobachteten Formen, welche bei vielen Stämmen weitaus überwiegen, ja fast ausschließlich vorhanden sind.

Während sich nämlich die oben beschriebenen Stäbchen und Scheinfäden mit allen Farbstoffen leicht und gleichmäßig tingierten, beobachtet man eine Anzahl von Bakterien, deren Leib die Farbstoffe nur teilweise aufnimmt. Sie zeigen in ihrem Innern kleine runde oder ovale, scharf begrenzte, blasse Lücken, welche entweder einzeln vorhanden sind oder in größerer Anzahl aneinandergereiht fast den ganzen Bakterienleib ausfüllen, sodaß nur eine gut tingierte Hülle, sowie ein blaßgefärbter oder gänzlich ungefärbter, etwas körnig aussehender Inhalt vorhanden ist. Wieder bei anderen sieht man, daß der Bakterienleib sowie dessen Hülle aufquillt, sich stellenweise ausdehnt, so daß es zu umschriebenen Verbreiterungen des Bakterienleibes kommt. Dieselben sind bei einzelnen Individuen nur klein, von einem zarten bläschenförmigen Aussehen und sind entweder central oder endständig gelegen. (Ein gleichzeitiges Vorkommen beider Formen an einem Bakterium wurde niemals beobachtet.) Bei anderen wieder sind die Auftreibungen mächtig und plump und können die Breite des Bakterienleibes bis auf das 10—20-fache übertreffen. In diesem Falle sind die centralen Auftreibungen fast regelmäßig spindelförmig, während die peripheren eine kugelige oder keulenförmige Form aufweisen. Die beschriebenen Auftreibungen nehmen die Farbstoffe nur wenig und ungleichmäßig auf, wodurch sie ein granuliertes oder krümeliges Aussehen bekommen.

Je üppiger das Wachstum und je frischer die Kultur, um so schöner lassen sich die einzelnen Stadien an verschiedenen Individuen verfolgen.

In älteren (2—3 Tage alten) Kulturen sind die Bakterien zum größten Teil in den beschriebenen kolbigen oder kugeligen Auftreibungen aufgegangen. An einzelnen dieser mächtigen Kolben sieht man noch einen kleinen Rest des Bakteriums als kurzen, wohlgefärbten Appendix angefügt.

Schon am 4.—5. Tage sind die wohldifferenzierten Bakterienindividuen fast vollständig verschwunden. Gleichzeitig verlieren diese Kolben ihre charakteristische Form, ihre Umgrenzung wird unregelmäßig, wodurch sie das Aussehen von Schollen und Fragmenten bekommen. In einem Ausstrichpräparate einer 5—8 Tage alten Agarkolonie sieht man dann bloß blaßgefärbte krümelige Massen, die das Gesichtsfeld vollständig ausfüllen, und zwischen denen nur ganz vereinzelte, wohlerhalten oder mehr oder weniger veränderte Bakterien zu sehen sind.

Ueberimpft man eine solche ältere Kultur auf einen frischen Nährboden, so sind schon nach 24 Stunden neuerdings die polymorphen Formen der ursprünglichen frischen Kulturen vorhanden. Diese machen neuerdings im Laufe der nächsten Tage alle Stadien der Umwandlung durch,

bis auch sie zu Schollen zerfallen. Wir haben diese eigentümlichen Veränderungen wiederholt geprüft und regelmäßig wiedergefunden.

Ueberimpft man dagegen frische oder ältere Agarkulturen, in welchen entweder die vielgestaltigen Bakterienformen oder bloß Bakterienschollen vorhanden waren, in eine Bouillon, so finden sich in letzterer, sowohl in einer frischen als auch in einer alten Kultur stets nur kleine plumpe Kokken und Diplokokken, sowie kurze Bacillen und Diplobacillen. Niemals war der eigentümliche Formenreichtum und Polymorphismus, welcher sich in den Agarkulturen vorfand, in den Bouillonkulturen nachzuweisen; nur im Sedimente ganz alter Bouillonkulturen waren mitunter spärliche schollige, blasse Gebilde zu beobachten.

Durch die Aussaat dieser Bouillonkulturen wurde auf Agarnährböden immer wieder eine polymorphe Bakterienflora erzielt und umgekehrt. Auch diese Variation auf flüssigen und festen Nährböden wurde wiederholt kontrolliert und regelmäßig gefunden.

Durch diese wiederholt ausgeführten Ueberimpfungen erst konnte mit Sicherheit festgestellt werden, daß es sich nicht etwa um Mischkolonieen handelte, sondern daß thatsächlich Reinkulturen eines Bakteriums vorlagen. Die Bakterien erwiesen sich in allen Stadien ihrer Entwickelung sowie auf allen Nährböden als Gram-negativ.

Trotz der zahlreichen Kulturversuche jedoch erscheint uns eine Einreihung des Bakteriums in eine bestimmte Gruppe bei dem Mangel des botanischen Systems kaum durchführbar.

Die Agarkolonieen besitzen durch ihre saftige Beschaffenheit eine große Aehnlichkeit mit der Friedländer-Gruppe, dagegen weisen sie durch das fast elektive Wachstum auf hämoglobinhaltigen Nährböden (insbesondere bei frischen Stämmen) eine charakteristische Eigenschaft der Influenzagruppe auf. Auch die mikroskopische Form der Bakterien schwankt in vieler Hinsicht zwischen diesen beiden Gruppen, während der ausgesprochene Polymorphismus als charakteristisch für die Proteus-Gruppe angeführt werden könnte. Gegen letztere Annahme spricht jedoch entschieden das mangelnde Wachstum in Gelatinenährböden.

In der Litteratur findet sich die Beschreibung einer Bakteriennart, welche einigermaßen eine Aehnlichkeit (insbesondere in den beigegebenen Abbildungen) mit der unseren aufweist, gleichzeitig jedoch manche charakteristische Differenzen zeigt. Ich will in Kürze die Beschreibungen derselben wiedergeben:

Bordoni fand in 3 Erkrankungsfällen, welche mit hämorrhagischen Veränderungen der Bronchial- und Darmschleimhaut, sowie der regionären Lymphdrüsen einhergingen, eigentümliche Bakterien, und es gelang ihm auch dieselben kulturell nachzuweisen. Er bezeichnet den Bacillus als den Krankheitserreger und nennt ihn „Proteus hominis capsulatus“[1]). Im Blute, sowie in den Organen hatte er eine Aehnlichkeit mit Milzbrandstäbchen, war jedoch meist plumper und in den Organen in anderer Lagerung zu finden. Er war eminent Gram-fest. Seine Züchtung gelang schon bei 15° C auf allen gebräuchlichen Nährböden, insbesondere auch auf Gelatine. Bei vorsichtig ausgeführter Färbung war eine Kapsel leicht nachweisbar. — Auf Agarnährböden wuchsen die Bacillen bei Bruttemperatur zu langen Fäden aus, während sie in Bouillon und Blutserum die Form kurzer freier Stäbchen hatten. Während erstere nach Gram färbbar waren, leisteten die kurzen Formen der Entfärbung durch Alkoholwirkung nur geringen Widerstand. In älteren Agarkulturen konnte er ferner eigentümliche Veränderungen der Bacillen beobachten, indem sie kugelige Auftreibungen zeigten, und in ganz alten Kulturen schließlich in kugeligen Schollen vollständig aufgingen. Aus den letzteren konnte er durch Ueberimpfung auf friche Nährböden neuerdings die langen Bakterienformen züchten.

---

1) Bordoni-Uffreduzzi, Ueber den „Proteus hominis capsulatus“ etc. (Zeitschr. f. Hygiene. Bd. III.)

— Frische Kulturen erwiesen sich bei intravenöser und intraperitonealer Injektion bei Mäusen und Kaninchen als pathogen.

Bordoni beobachtete demnach bei seinen Bakterien einen ähnlichen Formenwechsel auf festen und flüssigen Nährböden, wie wir sie beschrieben haben. Ferner beschreibt er ganz ähnliche kolbige Auftreibungen der Bakterienleiber und einen scholligen Zerfall derselben in älteren Kulturen. In Bezug auf dieses letztere Verhalten, welches auch wir beobachten konnten, kamen wir zu der Ansicht, daß es sich um eine eigentümliche, meist umschriebene, im Bakterienleib beginnende Degeneration des Protoplasmas handelt, welche den ganzen Mikroorganismus zum Quellen bringt, wobei die Hülle zum Schlusse zum Platzen gebracht wird und die schleimige Masse frei wird. Die gequollenen Bakterien sind jedoch da noch nicht zu Grunde gegangen, da sie auf geeignete Nährböden überimpft, neuerdings zu üppigen charakteristischen Formen auswachsen. Daß die oben beschriebenen Lücken, sowie die kolbigen Auftreibungen nicht etwa Sporen vorstellen, erscheint durch den weiteren Verlauf der Degeneration, sowie insbesondere aus der geringen Resistenz der Bakterien gegen Temperatursteigerungen bis auf 45—50° C auch im Stadium der üppigsten Kolbenbildung sichergestellt.

Ueber die pathogene Bedeutung der Bakterien waren wir lange im Zweifel, da dieselben sich nur selten in Reinkulturen, sondern größtenteils mit anderen pathogenen Keimen, insbesondere Influenza, Friedländer vermengt vorfanden. Allerdings war in einer großen Anzahl der beobachteten Fälle eine auffallend starke, anfallsweise auftretende, durch objektive Befunde schwer zu deutende Cyanose und Dyspnoë klinisch nachweisbar; doch ließ sich aus diesen Erscheinungen kein sicherer Schluß ziehen; erst entsprechende Obduktionsbefunde lieferten uns einen positiven Beweis, daß den Bakterien, wenigstens unter Umständen, eine pathogene Bedeutung zukommt.

Die erste Obduktion betraf die Leiche des S. J., bei dem im Verlaufe seiner tuberkulösen Erkrankung die Bakterien 9-mal im Sputum nachgewiesen wurden. Bei der Sektion fanden sich im wesentlichen folgende Veränderungen:

Ziemlich kräftige Leiche mit blassen Hautdecken und lividen Totenflecken. Das Gesicht gedunsen und stark cyanotisch. Die Schleimhaut der Trachea, sowie der großen Bronchen stark geschwellt und hämorrhagisch infiltriert. Die linke Lunge an der Spitze fester, in den unteren Partieen durch fadenförmige pleuritische Membranen nur lose mit dem Thorax verwachsen. Die rechte Lunge fast vollständig von einer derben ödematösen Schwiele bedeckt, in der Pleurahöhle ca. 500 ccm einer klaren serösen Flüssigkeit. Der linke Oberlappen luftleer, hämorrhagisch infiltriert, nur kleine gelbe, käsige Herde enthaltend, die Lunge in den übrigen Partieen gedunsen, blutreich. Der rechte Oberlappen schwielig induriert; in der Spitze eine etwa haselnußgroße Kaverne mit glatter, schwieliger Wand, an die sich rückwärts eine unregelmäßige Absceßhöhle anschließt und durch eine kleine Offnung mit der Kaverne kommuniziert. Die Schleimhaut der kleinen Bronchen beider Lungen hämorrhagisch infiltriert, stellenweise ist auch das Lungenparenchym von hämorrhagischen peribronchitischen Herden durchsetzt. Die bronchialen Lymphdrüsen sind stark geschwellt, dunkelblutrot infiltriert und zeigen keinerlei Verkäsungen. Der Herzbeutel ist stark erweitert, eine reichliche Menge einer klaren, serösen Flüssigkeit enthaltend. Das Herz ist schlaff. Die Klappen zart und schlußfähig. Die Leber ziemlich groß; ihr Parenchym blutreich. Die Milz ist deutlich vergrößert, die Pulpa dunkelrot, derb, die Follikel nicht vergrößert. Die Nieren groß und blutreich. Die Schleimhaut des Magens etwas geschwellt und injiziert; die Schleimhaut des Darmes blaß. Die mesenterialen Lymphdrüsen zeigen keinerlei pathologische Veränderungen.

Anatomisch konnte demnach bloß eine geringe tuberkulöse Veränderung beider Lungenspitzen mit Schrumpfung besonders des rechten Oberlappens nachgewiesen werden, es fehlte jedoch jedes Anzeichen eines

frischen Nachschubes der Tuberkulose, welchen die schweren Symptome im Leben haben erwarten lassen. Dagegen war die hämorrhagische Infiltration des linken Oberlappens, die hämorrhagische Infiltration der Schleimhaut, der Luftwege, sowie der peribronchialen Lymphdrüsen auffallend.

Histologisch fanden wir neben den Anzeichen einer chronischen und subakuten Tuberkulose im linken Oberlappen die Alveolen mit Blut ausgegossen, die Schleimhaut der Bronchen blutig infiltriert. In den Blutextravasaten der Alveolen fanden sich ganze Konglomerate und Häufchen von Diplokokken, dagegen waren in den Blutkapillaren nirgends Bakterien nachweisbar. Allerdings konnten einzelne Individuen durch die außerordentlich leichte Entfärbbarkeit der Bakterien durch die Einwirkung des Alkohols in den Schnitten sehr leicht entgehen.

Die mikroskopische Untersuchung des Bronchialsekretes, sowie des Kaverneninhaltes zeigte, ähnlich den Befunden im Leben, zahlreiche plumpe Diplokokken neben spärlichen Tuberkelbacillen. Aus dem Kaverneninhalte ließ sich eine reichliche Menge der irisierenden Kolonieen züchten, welche fast ausschließlich lange Stäbchen mit prächtigen Kolben enthielten. Weder Influenza noch Friedländer konnte diesmal daneben nachgewiesen werden.

Die zweite Obduktion betraf den Patienten N. J. (Fall III), bei welchem das erste Mal eine beiderseitige Spitzeninfiltration nachgewiesen wurde, während sich bei seiner nach 3 Monaten erfolgten Wiederaufnahme eine akut aufgetretene linksseitige Pneumonie konstatieren ließ.

Bei der Obduktion war folgender Befund zu erheben: Phthisis tuberc. chron. apic. pulm. utriusque. Caverna lobi inf. pulm. dextri, Tuberculosis subacuta granularis pulmonum. Pneumonia croup. in stadio hepatisationis rubrae lobi inf. pulm. sinistri cum pleuritide fibrinosa-haemorrhagica sin. Emphysema pulmon. Nephritis acuta cum degeneratione adip. Icterus levis. Anaemia.

Die peribronchialen Lymphdrüsen wurden leider keiner näheren Untersuchung unterzogen.

Die histologische Untersuchung zeigte neben den teils alten, teils frischeren tuberkulösen Veränderungen im linken Unterlappen eine frische pneumonische Infiltration und in diesen ausgebreitete Hämorrhagieen, sowohl in den Lungenalveolen als auch in dem interstiellen Gewebe und der stark geschwellten Mucosa der Bronchialschleimhaut; an der Pleura frische Fibrinauflagerungen mit reichlichen dazwischenliegenden roten Blutkörperchen.

Im pneumonischen Exsudate fanden sich mikroskopisch auschließlich zahlreiche Diplokokken. Auch in der Kultur wurden die irisierenden Kolonieen in Reinkulturen nachgewiesen.

Da bei diesem Patienten 3 Monate vorher dreimal die Bakterien in großer Menge im Sputum nachgewiesen worden waren, besteht kein Zweifel, daß sich dieselben, wahrscheinlich in den Kavernen, erhielten und weiter vermehrten, dann plötzlich eine frische Infektion der linken Lunge verursachten, die zu einer pneumonischen Infiltration führte, welcher der ohnehin schon geschwächte Patient rasch erlag.

Wir sehen in beiden Fällen den ausgesprochenen hämorrhagischen Charakter der anatomischen Veränderungen, eine Erscheinung, auf welche auch in vivo in einzelnen Fällen durch das ausgesprochene hämorrhagische Sputum geschlossen werden konnte.

Zur weiteren Feststellung der Pathogenität wurden zwei Meerschweinchen mit dem beiden Kulturen, welche aus dem Bronchialeiter der beiden Leichen gewonnen wurden, intraperitoneal geimpft. In bei-

den Fällen wurde 1 ccm einer 24-stündigen Blutbouillonkultur verwendet. Beide Meerschweinchen zeigten in den ersten Tagen eine große Hinfälligkeit, erholten sich jedoch rasch und gingen erst nach 5 Wochen ein. Bei dem einen fand sich eine hämorrhgisch-eiterige Pleuritis vor. Mikroskopisch enthielt der Eiter zahlreiche plumpe Diplokokken, welche jenen im Bronchialsekrete gefundenen sehr ähnlich waren. Die Kultur mißlang infolge Verunreinigung der Kulturplatten. Bei dem zweiten Meerschweinchen war eine eiterige Pleuropneumonie vorhanden. Sowohl das pneumonische als auch das pleuritische Exsudat enthielt zahlreiche Diplokokken. Kulturell wurden in beiden ausschließlich die irisierenden Kolonieen nachgewiesen.

Einem dritten Meerschweinchen wurde eine Bouillonkultur der Bakterien, welche in diesem Falle aus einer Pneumonie gezüchtet wurden, intraperitoneal eingespritzt. Dieses Versuchstier ging gleichfalls erst nach 5 Wochen ein. Die Sektion ergab auch in diesem Falle den Befund einer hämorrhagischen Pleuropneumonie. Im Exsudate fanden sich Diplokokken vor. Kulturell wurden die irisierenden Kolonieen in Reinkulturen nachgewiesen.

In letzter Zeit wurden noch zwei Tierversuche mit älteren Stämmen ausgeführt, welche jedoch negativ ausfielen, indem das eine Tier (Maus) die subkutane Injektion überlebte, das zweite (Meerschweinchen) auf eine intraperitoneale Injektion nach 4 Wochen starb, jedoch keinerlei anatomische Veränderungen aufwies und auch die Bakterien kulturell nicht nachgewiesen werden konnten.

Der mikroskopische Nachweis in den Schnitten der Tierorgane gelang nur unvollkommen, indem die gebräuchlichen basischen Anilinfärbungen für die Schnittfärbung versagten, offenbar weil der Alkohol auch bei kurzer und vorsichtiger Einwirkung die Bakterien komplett entfärbte. Eine relativ gute Färbung ließ sich nur bei Verwendung von Thionin erzielen, und es zeigten sich in solchen Präparaten, insbesondere in den Blutergüssen der Alveolen, Häufchen von Diplokokken, die ähnlich den Pestbacillen in Schnitten von einer homogenen unfärbbaren Schleimmasse zu Zoogloea-artigen Bildungen vereint waren. Ein mikroskopischer Nachweis in den Blutgefäßen oder in den anderen Organen gelang nicht, doch ist diesem negativen Befund bei der Schwierigkeit der Färbung kein besonderes Gewicht beizulegen.

Da es leider unterlassen wurde, Blut und Milz kulturell zu untersuchen, so muß eine exakte Beurteilung der pathogenen Wirkungen für später vorbehalten bleiben[1]). Mit Sicherheit läßt sich jedoch annehmen, daß das beschriebene Bakterium sowohl morphologisch als auch durch die in den einzelnen Fällen verursachten klinischen und anatomischen Veränderungen von den bisher bekannten zu trennen ist und auch mit den recht ähnlichen bakteriellen und anatomischen Befunden Bordoni's nicht identifiziert werden kann.

Zum Schlusse sei mir noch gestattet, Herrn Prof. Kretz meinen besten Dank für die überaus liebenswürdige Unterstützung auszusprechen.

1) Ein Stamm des Bakteriums wurde der Král'schen bakteriologischen Sammlung in Prag einverleibt.





Ueber die toxischen Lähmungen carbunculöser (milzbrandiger) Natur.

[Aus dem hygienischen Institut der königl. Universität Siena.]

Von Dr. med. **Achille Sclavo**,
Professor der Hygiene an der Universität Siena[1]).

Uebersetzt von Dr. med. Armin Müller, Zürich.

Unsere Kenntnis der Bakteriengifte hat sich in den letzten Jahren sehr erweitert, besonders durch die Forschungen von Ehrlich. Er fand in dem Filtrat von Bouillonkulturen des Diphtheriebacillus, daß neben den wahren eigentlichen Toxinen, die imstande sind, in einer bestimmten Dosis Meerschweinchen akut zu töten, verschiedene andere Substanzen sich vorfinden, welche, obgleich sie mit den Toxinen die Eigenschaft, sich mit dem Antitoxin zu verbinden, gemein haben, entweder nicht pathogen sind oder eine langsame und weniger schwere toxische Wirkung ausüben.

Eine Gruppe dieser Substanzen erhielt den Namen „Toxone“ und ihre Existenz wurde durch eine höchst erwähnenswerte Untersuchung Ehrlich's nachgewiesen.

Allen ist bekannt, wie vor einiger Zeit auf Vorschlag dieses Forschers der Wert des Antidiphtherieserums in Immunitätseinheiten bestimmt wurde, deren eine jede diejenige Menge Serum darstellte, welche imstande ist, 100 minimal tödliche Dosen (DMM) Diphtheriegift für Meerschweinchen (250—300 g) zu neutralisieren in der Weise, daß die einem dieser Tiere subkutan eingespritzte Mischung dasselbe weder tötete, noch am 2. Tage das geringste Oedem um die Injektionsstelle herum verursachte.

Wenn man einer derartigen Mischung, wie Ehrlich that, eine DMM von Diphtheriegift hinzufügt, könnte man glauben, daß das Tier sterben müsse nach Verlauf von 4—5 Tagen; dies tritt jedoch nicht ein und die Zahl der DMM, welche man hinzufügt, kann eine beträchtliche Ziffer erreichen, bisweilen sogar auf 101 steigen, bevor das Meerschweinchen am 4.—5. Tage stirbt und die Wirkung einer einzigen DMM von Diphtheriegift zeigt. Es kommt indessen vor, daß die vollständig neutralisierte Mischung, sobald Diphtheriegift, wenn auch nur im Verhältnis einer einzigen DMM, hinzugefügt worden ist, ein mehr oder weniger beträchtliches lokales Exsudat verursacht, welches ziemlich rasch wieder verschwindet, ohne daß es zu Hautnekrose noch zu Haarausfall kommt. Nach einiger Zeit, gewöhnlich erst nach der 3. Woche, treten häufig Lähmungserscheinungen auf, welche in der Regel den Tod zur Folge haben.

Ehrlich erklärt diese Erscheinung, indem er annimmt, daß die neu hinzufügten Toxine andere analoge, jedoch weniger energische und weniger toxische Substanzen aus ihrer Verbindung mit dem Antitoxin herausreißen und diese eben wurden Toxoni und auch Epitoxoide genannt.

Zur klaren Erläuterung dieser Annahme Ehrlich's pflege ich zu

---

1) Vortrag, gehalten in der Accademia dei Fisiocritici in Siena am 22. Februar 1902.

didaktischen Zwecken ein sehr einfaches Experiment zu Hilfe zu nehmen:

Ich nehme zwei normale Lösungen von Salz- und Essigsäure, gieße von jeder 10 ccm in ein Erlenmeyer'sches Fläschchen und füge darauf 20 ccm einer ebenfalls normalen Natriumhydratlösung hinzu, wodurch ich eine auf Lackmuspapier vollkommen neutral reagierende Flüssigkeit erhalte. Das Natrium ist hier an die Säuren gebunden wie das Antitoxin an die Diphtheriegifte und das Lackmuspapier, welches absolut keine Reaktion zeigt, vertritt die Rolle des Meerschweinchens, welches ohne lokale noch allgemeine Störung die Injektion der 100 DMM des Diphtheriegiftes auf 1 U. I (Immunitätseinheit) Antidiphtherieserum erträgt.

Darauf färbe ich die Flüssigkeit mit ein wenig Methylviolett, welches die Eigenschaft besitzt, seine Farbe nicht zu verändern in Gegenwart einer organischen Säure (z. B. Essigsäure), während es grünblau wird, sobald eine Spur einer freien Mineralsäure (z. B. Salzsäure) vorhanden ist.

Wenn ich daher die normale Salzsäurelösung tropfenweise in die violette Flüssigkeit fallen lasse, sehe ich während einer bestimmten Zeit keine grünblaue Färbung auftreten, wie auch der Tod der Meerschweinchen ausbleibt, welche die Mischung aus 1 U. I. aus 100 DMM Diphtheriegift und einer gewissen Zahl DMM dieses Giftes darüber hinaus erhalten haben.

Indessen ändert die Salzsäure sofort die Farbe einer rein wässerigen Lösung von Methylviolett und macht die erstere Flüssigkeit deutlich sauer auf Probe mit Lackmuspapier, wodurch sich eine genaue Analogie mit der Erfahrung Ehrlich's ergiebt, wo das Tier, wenn man die Zahl der DMM um eine oder mehr über die 100 durch das Serum neutralisierten hinaus vermehrt, zwar nicht stirbt, aber Reaktionserscheinungen an der Impfstelle und späterhin Zeichen von Lähmungen zeigt.

Um den Farbenwechsel von violett in grünblau zu bekommen, muß man in die neutrale Lösung[1]) mehr als 10 ccm der Salzsäurelösung gießen. Diese Salzsäure nämlich verdrängt sofort die weniger energische Essigsäure aus ihrer Verbindung mit dem Natrium, indem sich Chlornatrium bildet, und erscheint erst dann in freier Form, nachdem keine Spur von essigsauerem Natrium mehr in der Flüssigkeit vorhanden ist.

Wie die Essigsäure, würden sich also die Toxone verhalten, und die Salzsäure würde jene anderen Substanzen darstellen, welche wie z. B. die Toxine größere Affinität zum Diphtherieantitoxin haben.

Ebenso steht also fest, daß, während die Meerschweinchen nie gelähmt werden, wenn sie entweder Diphtheriekulturen oder toxische und nicht zu alte Filtrate derselben erhalten, die Lähmungen auftreten, wenn man gleichzeitig mit diesen geringe Dosen Antidiphtherieserum anwendet.

Ebenso ist bekannt, daß in der ersten Zeit, in welcher das Diphtherieserum in Anwendung kam, vielleicht weil man weniger energisch wirkendes Serum gebrauchte, man zwar eine Verringerung der Mortalität erhielt, dafür aber die postdiphtherischen Lähmungen häufiger auftraten.

---

1) Damit das Experiment gut gelingt, erwärmt man den Inhalt des Erlenmeyer'schen Fläschchens, solange er noch neutral auf Lackmuspapier reagiert, auf dem Wasserbad. Auf diese Weise wird der Zonenwechsel begünstigt und die Farbenveränderung wird deutlicher.

Eine ähnliche Erscheinung ist mir bei den Kaninchen gelegentlich des Milzbrandes begegnet. Niemand hat meines Wissens bis dahin von Lähmungen gesprochen, welche infolge subkutaner Infektion der Tiere mit Milzbrandbacillen auftreten, während mir in den 3 Jahren seit meiner Uebersiedelung von Sassari nach Siena sich Gelegenheit bot, 9 Kaninchen von 352 lahm werden zu sehen, welche zur Bestimmung der Stärke des Antimilzbrandserums die Milzbrandkultur subkutan und das Serum intravenös erhalten hatten. Bei allen 9 Kaninchen trat die Lähmung von Sensibilität wie Motilität an den hinteren Extremitäten auf, begleitet von unfreiwilligem Abgang von Faeces und Urin. Es handelt sich offenbar um eine Affektion des Rückenmarkes. Auf die schlaffe Lähmung der ersten Tage folgte die Kontraktion der Glieder bei den überlebenden Kaninchen.

Im ganzen jedoch war das Ueberleben nicht von langer Dauer und der Tod trat bisweilen unversehens ein, in anderen Fällen wieder gingen ihm Lähmungen der vorderen Extremitäten voraus.

Ich fasse hier kurz die Krankengeschichte von 8 der lahm gewordenen Kaninchen zusammen und bemerke, daß die Dose der injizierten Kultur imstande war, bei den Kontrolltieren den Tod in 24 bis 40 Stunden herbeizuführen.

Kaninchen No. 1 — 1610 g

13. August 1899	erhält 5 ccm Serum vom Schaf intravenös, und die Milzbrandkultur subutan.
3. Sept. 1899	Sensibilitäts- und Motilitätslähmung der unteren Extremität mit Faeces und Urinabgang.
8. „ 1899	Exitus letalis.

Kaninchen No. 2 — 1420 g

24. Juni 1900	Erhält intravenös 2 ccm Serum vom Schafbock und die Kultur subkutan.
11. Juli 1900	Lähmung wie bei Kaninchen No. 1.
13. „ 1900	Exitus letalis.

Kaninchen No. 3 — 1500 g

21. Juli 1900	Erhält intravenös 1 ccm Schafbockserum und die Kultur subkutan.
15. August 1900	Lähmung wie beim Kaninchen No. 1.
23. „ 1900	Kontraktionen an der hinteren Extremität.
25. „ 1900	Exitus letalis.

Kaninchen No. 4 — 1450 g

3. Sept. 1900	Erhält intravenös 2 ccm Schafserum und subkutan die Kultur.
25. „ 1900	Lähmung wie bei Kaninchen No. 1.
30. „ 1900	Exitus letalis.

Kaninchen No. 5 — 1370 g

28. Oktober 1900	Erhält intravenös 2 ccm Schafbockserum und subkutan die Kultur.
20. Nov. 1900	Lähmung wie bei Kaninchen No. 1.
23. „ 1900	Exitus letalis.

Kaninchen No. 6 — 1400 g

30. Nov. 1900	Erhält intravenös 2 ccm Schafserum und subkutan die Kultur.
16. Dez. 1900	Lähmung wie bei Kaninchen No. 1.
21. „ 1900	Exitus letalis.

Kaninchen No. 7	1300 g
14. Mai 1901	Erhält intravenös 2 ccm Schafbockserum und subkutan die Kultur.
1. Juni 1901	Lähmung wie bei Kaninchen No. 1.
9. „ 1901	Exitus letalis infolge Septicaemia carbonchiosa.
Kaninchen No. 8	1450 g
22. Dez. 1901	Erhält intravenös 2 ccm Schafserum und subkutan die Kultur.
22. Januar 1902	Um 5 Uhr nachmittags erhält es neuerdings intravenös 2 ccm Schafserum und subkutan die Kultur. Im Moment der Injektion schien es, daß das Tier eine leichte Lähmung der hinteren Extremität zeigte.
23. „ 1902	typische Lähmung wie bei Kaninchen No. 1.
27. „ 1902	Exitus letalis.

Die Thatsachen, welche aus vorstehender Zusammenstellung hervorgehoben zu werden verdienen, sind folgende:

1) Die Lähmungserscheinungen zeigten sich ziemlich spät, vom 16.—31. Tage nach stattgehabter Injektion von Serum und Kulturen.

2) Dieselben traten immer in derselben Art auf, weil im Anfang die nämlichen Rückenmarkspartieen lädiert wurden.

3) Bei einem Kaninchen zeigte sich die Lähmung am 17. Tage und das Tier erlag der Milzbrandinfektion 25 Tage nach stattgehabter Inokulation.

Dieses ist das längste Intervall, welches ich bis dahin bei Kaninchen, die mit Serum und Kultur behandelt wurden, beobachtet habe zwischen dem Zeitpunkt der Inokulation und dem des Todes durch Milzbrand.

4) Eine zweite Infektion von Milzbrand und Serum in ein schon gelähmtes Kaninchen (No. 8) hatte keine Allgemeininfektion zur Folge und das Tier starb wie die anderen an Lähmungen.

Bei der Autopsie fand ich immer die Eingeweide frei von Mikroben, ausgenommen Kaninchen No. 7, von welchem ich die Entwickelung der Keime des Milzbrandes in Reinkultur mit von überall hergenommenem Material erhielt.

Eine genaue Betrachtung des Rückenmarkes der anderen Kaninchen zeigte mir keine Veränderung und nie entwickelten sich Keime auf den mit beträchtlichen Quantitäten Rückenmarksubstanz besäten Nährböden.

Ich behalte mir vor, bei anderer Gelegenheit über den systematischen histologischen Befund des Rückenmarkes zu referieren. Angesichts der von mir oben angeführten Resultate muß man denken, die beobachteten Lähmungen seien toxischen Ursprunges. Deshalb habe ich gesucht, ob in den verschiedenen Arbeiten, welche zeigen sollten, daß spezifische, vom Milzbrandbacillus verursachte Gifte existieren, sich irgend eine Substanz fände, die imstande wäre, lähmend auf das Nervensystem zu wirken.

Man muß annehmen, daß der Milzbrandbacillus imstande ist, specielle toxische Substanzen zu bilden, um die Symptome erklären zu können, welche die Milzbrandinfektion charakterisieren. Als solche Giftwirkungen sind zweifellos zu betrachten sowohl der Zerfall der roten Blutkörperchen als auch die bisweilen enormen Oedeme und die Störungen des Allgemeinbefindens, welche z. B. beim Menschen oft sehr schwer sind,

während bei ihm die Tendenz des Bacillus, ins Blut überzugehen, gewöhnlich gering ist. Aber die zahlreichen direkten Versuche, die Milzbrandgifte zu finden, führten nicht zu einheitlichen Resultaten.

Während Conradi[1]) behauptet, daß es in keiner Lebenslage des Milzbrandbacillus möglich ist, ein von ihm produziertes spezifisches Gift nachzuweisen, spielen wieder Andere auf verschiedene und verschieden wirkende Produkte an, welche ihren Ursprung dem Milzbrandkeime verdankten.

Jedoch allein in einer Arbeit von Marmier[2]) findet ein lähmend wirkendes Gift flüchtige Erwähnung, ein Gift, welches, von speziellen Milzbrandkulturen erhalten, bei Kaninchen kurz vor dem Tode Motilitäts- und Sensibilitätsverlust der hinteren Extremitäten erzeugte.

Der Autor indessen mißt diesen Erscheinungen so geringe Wichtigkeit bei, daß er sie am Ende der Arbeit in den Schlüssen nicht mehr erwähnt, und bloß von der schwächenden Wirkung des Giftes spricht.

Es ist wahr, daß Marmier jene Lähmungen erst unter den prägonalen Symptomen beobachtete, während ich sie mehrere Tage vor dem Exitus konstatierte; der Grund hiervon liegt sehr wahrscheinlich in dem zur Verwendung gekommenen Milzbrandserum.

Damals, als ich die ersten Fälle von Lähmungen sah, konnte ich mich nicht des Gedankens erwehren, daß auch das Serum der verschiedenen zur Anwendung gekommenen Tiere imstande sei, diese Erscheinungen zu produzieren; indes beruhigte mich sofort der Gedanke, daß niemals Lähmungserscheinungen bei einem derjenigen Kaninchen auftraten, welchen ich beträchtliche Serummengen eingespritzt hatte, bevor ich mich entschloß, dasselbe beim Menschen anzuwenden.

Ueberdies wurde ein solcher Zweifel vollständig beseitigt durch das, was sich bei einem Kaninchen ereignete, welches ich in einer Reihe von Versuchen über die Immunitätsdauer gegen den Milzbrand verwendete.

Kaninchen	1160 g
14. Mai 1901	Erhält intravenös 2 ccm Milzbrandserum und subkutan Milzbrandkultur.
7. Juni	Milzbrandkultur subkutan.
5. Juli	Desgl.
21. „	Desgl.
21. Januar 1902	Desgl.
10. Febr. 1902	Zeigt Sensibilitäts- und Motilitätslähmungen an den hinteren Extremitäten. Unfreiwilliger Harn- und Stuhlabgang.
15. „ 1902	Das Kaninchen kann wieder einige Bewegungen mit der hinteren Extremität ausführen.
17. „ 1902	Der schlaffen Lähmung sind die Kontrakturen gefolgt. Das Kaninchen ist stark abgemagert.
24. „ 1902	Exitus 9,30 vormittags. Sofortige Sektion.

Wie aus obiger Zusammenstellung hervorgeht, hatte dieses Kaninchen (A) wiederholt Kulturen von Milzbrandbacillen erhalten und eine kräftige Immunität davongetragen. Vom 21. Juli 1901 wurde es 6 Monate hindurch in Ruhe gelassen zusammen mit einem anderen Kaninchen B, welches gleichbehandelt worden war.

---

1) Conradi, H., Zur Frage der Toxinbildung bei den Milzbrandbakterien. (Zeitschr. f. Hyg. Bd. XXXI. p. 287.)

2) Marmier, L., Sur la toxine charbonneuse. (Annales de Institut Pasteur. 1895. p. 533.)

Am 21. Januar dieses Jahres erhielten beide Kaninchen A und B subkutan 1 ccm einer Emulsion von sehr virulenter Milzbrandkultur, welche in weniger als 24 Stunden in gleicher Dosis 2 Kontrollkaninchen tötete. Während das Kaninchen B ohne irgend eine Störung am Leben blieb, zeigte das Kaninchen A nach 20 Tagen die typische Lähmung der hinteren Glieder, begleitet von der des Rektums und der Blase. Nach abermals 7 Tagen traten die Kontrakturen auf und der Tod hatte statt am 34. Tage der Infektion, ohne daß sich etwas Spezielles bei der Sektion fand und indem die Organe auf die gewöhnlichen sich als steril erwiesen.

Die Lähmungen sind bei diesem Kaninchen aufgetreten, weil offenbar seine Immunität auf dem Punkte stand, zu erlöschen, da es seit 6 Monaten keine Kultur mehr erhalten hatte; ebensowenig kann man hier die Lähmungen dem Serum zuschreiben, welches nur 1mal in der gewohnten Dosis von 2 ccm und vor mehr als 8 Monaten injiziert worden war.

Wir haben daher ein Gift carbunculösen Ursprunges, welches die unteren Partieen des Rückenmarkes bevorzugt, indem es langsam seine Wirkung auf sie ausübt.

Durch diese letztere Eigenschaft, welche dieses Gift gemein hat mit den Toxonen der Diphtherie, erhellt, warum die Lähmungen nicht bei Tieren auftreten können, welche mit Milzbrandbacillen infiziert worden sind, weil der Tod zu schnell eintritt. Wenn dagegen durch das Serum die Verteidigungskraft des Organismus einigermaßen erhöht wird, kann gut einmal der Tod der Milzbrandbacillen eintreten, aber diese werden in einigen lange genug gelebt haben, um das lähmende Gift zu erzeugen.

In der That sind diese speziellen Verhältnisse und die Kaninchen selten, welche Lähmungen aufweisen, im Vergleich zu jenen, die ohne jede Störung die Injektion von Serum und Kultur überleben.

Hier halte ich es auch für am Platze, zu bemerken, daß während der ganzen Zeit vor 1898 und hauptsächlich in den Laboratori della Sanità in Rom mir bei meinen Experimenten mit einer ziemlich erheblichen Zahl von Kaninchen nie jene Lähmungen, die ich oben genannt, begegnet sind.

Dies mag davon abhängen, daß die damals von mir verwandten Keime weniger geeignet waren, das lähmende Gift zu produzieren, indem sie sich hierin gleich wie einige Varietäten von Diphtherie- und Tetanusbacillen verhalten, wie es auch möglich wäre, daß diese Thatsache mit den Modifikationen in Verbindung stände, welche ich zum Immunisationsprozeß der zur Serumproduktion bestimmten Tiere eingeführt habe.

Ich hoffte in der That lange Zeit hindurch, den Wert des Milzbrandserums zu erhöhen, indem ich die Quantität der den Tieren zu injizierenden Milzbrandkultur vermehrte und gelangte soweit, daß ich auf ein einziges Mal 300 ccm einer dichten Emulsion von Milzbrandbacillen in das Peritoneum eines Schafbockes spritzen konnte.

Später, als mir dieses Vorgehen unnütz schien, reduzierte ich jene Dosen stark und suchte vor allem die Virulenz der Keime, welche ich injizierte, sehr erhöht zu konservieren.

Damit habe ich vielleicht darauf verzichtet, im Körper des Tieres, in welchem die Produktion der Milzbrandgifte in einem gewissen Verhältnis zur Quantität der eingespritzten Keime stehen müßte, die Bildung der

Substanzen zu erhalten, welche imstande sind, diese Gifte zu neutralisieren; mit anderen Worten: Das von mir später erhaltene Serum hätte wohl die Fähigkeit besessen, die Phagocytose zu erhöhen, wie auch das bactericide Vermögen der Säfte und war dadurch imstande, die Septicaemia carbunculosa wegzubeschwören, dagegen wäre die antitoxische Kraft geringer oder vielleicht ganz fehlend gewesen, weshalb auch die Möglichkeit des Auftretens der Lähmungen.

Rücksichtlich dessen habe ich beschlossen, mich etwas der früheren Immunitätsmethode zu nähern, indem ich die Dosen der Kulturen, welche ich in den letzten Jahren angewandt habe, wieder etwas erhöhe.

Die Leukocytose nach Digitalisgebrauch bei Pneumonieinfektion.

[Aus dem Laboratorium für Parasitologie an der kgl. Universität Turin (Perroncito). (Direktor der Sektion: Prof. Dr. Bruschettini).]

Von Dr. **A. Borini.**

I.

Der durch Petrescu wieder zu Ehren gekommene und von fast allen modernen Klinikern angenommene Gebrauch der Digitalis bei Behandlung der Pneumonie hat so glänzende Erfolge geliefert, daß man natürlicherweise zu erforschen suchte, welcher von den Eigenschaften der Digitalis oder ihrer Derivate diese auffallend heilsame Wirkung zuzuschreiben sei. Zuerst nahm Naegeli-Akerblom an, die wohlthätige Wirkung dieses Mittels bei Pneumonie sei von seiner leukocytären Eigenschaft herzuleiten.

Die Wichtigkeit der Leukocytose bei Infektionen ist in den letzten Jahren vielfach studiert worden, aber diese Frage ist noch nicht genau bestimmt worden und erfordert weitere Beobachtungen, um in ihrem innersten Wesen deutlich erkannt zu werden. Im allgemeinen hat man beobachtet, daß bei Infektionskrankheiten nach Injektion irgend eines pathogenen Bacillus die Zahl der Leukocyten schnell abnimmt, und daß auf diese Abnahme eine schnelle Zunahme folgt, welche in geradem Verhältnis zu der Schwere der Infektion steht. Während bei der Hypoleukocytose besonders die Lymphocyten abnehmen, vermehrt sich bei Hyperleukocytose dagegen die Zahl der vielkernigen Leukocyten.

Wir besitzen hierüber zahlreiche Beobachtungen. So ist bei Diphtheritis, Blattern, Scharlach, Keuchhusten, Tuberkulose bedeutende Hyperleukocytose beobachtet worden. Auch bei Pneumonie ist von verschiedenen Autoren Zunahme der Leukocyten gefunden worden, so von Rieder, Limbeck, Löper, Sadler u. s. w. Durch Experimente ist die Leukocytose bei der Pneumonieinfektion besonders von Schlösinger und Motta-Coco studiert worden. Motta-Coco gelangt zu dem Schlusse, daß auf die Injektion abgeschwächter Kulturen des Pneumococcus Hyperleukocytose folgt (besonders von großen, einkernigen); daß der darauf folgenden Hypoleukocytose Erscheinungen von Karyolysis vorhergehen, die bis zur Leukocytolysis gehen können, und daß die Zahl und die Alterationen der Leukocyten im umgekehrten

Verhältnisse zu der Zahl und der Virulenz der im Blute befindlichen Pneumokokken stehen.

Schlösinger seinerseits kommt zu dem Schlusse, daß bei Pneumonieinfektionen mit günstigem Ausgange immer unregelmäßige Hyperleukocytose ohne besondere Erscheinungen vorhanden ist, und daß bei tödlichen Fällen fortschreitende Hypoleukocytose mit polynukleärer Reaktion gefunden wird.

Zuletzt erwähne ich noch, daß Lucatello in der Klinik Maragliano's eine neutralisierende Wirkung des Digitalins auf das Pneumonietoxin angegeben hat. Diese Behauptung scheint mir übrigens ein wenig gewagt, teils weil das Vorhandensein eines Pneumonietoxins im strengen Sinne des Wortes sehr zweifelhaft ist, besonders nach den schönen Untersuchungen Carbone's über die Pneumonieinfektion, teils weil eine Substanz in vitro eine antitoxische Wirkung ausüben und im Organismus ganz unwirksam sein kann.

Mit Annahme der Wichtigkeit der Leukocytose bei Infektionen und des leukocytären Vermögens der Digitalis, das zuerst von Naegeli-Akerblom beobachtet wurde, hat Gazza eine Reihe von Untersuchungen angestellt, um diese Erscheinung durch Experimente an Kaninchen zu studieren. Er gebrauchte Aufguß von Digitalis, Digitalin und Digitoxin. An erster Stelle konnte Gazza die leukocytäre Eigenschaft dieser Präparate bestätigen, besonders die des Digitoxins; zweitens zeigte er, daß diese durch Digitalis hervorgerufene Leukocytose den Tod mit Pneumococcus infizierter Kaninchen bedeutend verzögert, und zwar auch dann, wenn die Digitalis nach Injektion des virulenten Materials dargereicht wird.

II.

Da die Digitalis außer ihrem leukocytären Vermögen auch bedeutenden toxischen Einfluß auf das Herz ausübt, das bei Pneumonie das am aufmerksamsten zu beobachtende Organ darstellt, wollte ich untersuchen, ob auch andere leukocytäre Substanzen einen günstigen Einfluß auf den Verlauf der experimentellen Pneumonieinfektion ausüben.

Ich benutzte dazu eine Emulsion von Aleuronat (Merck) in physiologischer Chlornatriumlösung, welche intensive Leukocytose hervorbringt. Die subkutanen Injektionen wurden immer mit der nötigen antiseptischen Vorsicht ausgeführt. Das Versuchstier war das Kaninchen, das bekanntlich für Pneumonieinfektion sehr empfindlich ist. Als virulentes Material benutzte ich 24 Stunden alte Kulturen in defibriniertem Kaninchenblut von einem Pneumococcus, der Tiere von ungefähr 1 kg in der Dosis von $^1/_{20}$ ccm in 24 Stunden tötete. Andere Male benutzte ich einen weniger wirksamen Pneumococcus, der in derselben Zeit in der Dosis von 1 ccm dieselbe Wirkung thut.

Aus den angeführten Experimenten (p. 209) folgt:

1) Daß entsprechend den Beobachtungen Gazza's die mit Digitalin behandelten Tiere der Pneumonieinfektion viel länger widerstehen, als die Kontrolltiere. Wenn bei meinen Experimenten die mit Digitalin injizierten Tiere weniger lange gelebt haben, als bei Gazza, so muß man dies ohne Zweifel der stärkeren Virulenz des von mir benutzten Pneumococcus zuschreiben.

2) Daß die mit Aleuronemulsion behandelten Tiere in ihrer Empfänglichkeit für den Pneumococcus keinen Unterschied gegenüber den Kontrolltieren aufweisen.

Bericht über einige Experimente.

1. Experiment.

Tag	Kaninchen 1. Injiziert mit Aleuron	Kaninchen 2. Injiziert mit Digitalin	Kontrolltier
1. Tag	5 ccm subkutan	1 mg subkutan	
2. „	5 „ „	1 „ „	
3. „	5 „ „	1 „ „	
4. „ 11 Uhr	10 „ „	1 „ „	
4. „ 16 „	Injektion des Pneumococcus	2 „ „	
5. „	Tod um 17 Uhr ungefähr	Injektion des Pneumococcus	Injektion des Pneumococcus
6. „		Tod um 15 Uhr (22 Stdn. nach dem Kontrolltier)	Tod nach ungefähr 17 Stunden

2. Experiment.

Tag	Kaninchen 1	Kaninchen 2	Kontrolltier
1. Tag	12 ccm Aleuron	1 mg Digitalin	
2. „	12 „ „	1 „ „	
3. „	14 „ „	1 „ „	
4. „ 11 Uhr	14 „ „	2 „ „	
4. „ 14 „	Injektion des Pneumococcus	Injektion des Pneumococcus	Injektion des Pneumococcus
5. „	Tod um 21 Uhr		Tod um 16 Uhr 30 Min.
7. „		stirbt um 6 Uhr (37 Std. 30 M.n.d.Kontrolltiere)	

3. Experiment.

Tag	Kaninchen 1	Kaninchen 2	Kontrolltier
1. Tag	10 ccm Aleuron	1 mg Digitalin	
2. „	10 „ „	1 „ „	
3. „	10 „ „	1 „ „	
4. „ 11 Uhr	10 „ „	1 „ „	
4. „ 14 „	Injektion des Pneumococcus	Injektion des Pneumococcus	Injekt. d. Pneumococc. Tod um 18 Uhr
6. „	Tod um 19 Uhr		
8. „		Tod um 6 Uhr (36 Stdn. nach dem Kontrolltier)	

4. Experiment.

Tag	Kaninchen 1	Kaninchen 2	Kontrolltier
1. Tag	10 ccm Aleuron	1 mg Digitalin	
2. „	10 „ „	1 „ „	
3. „	10 „ „	1 „ „	
4. „ 16 Uhr	10 „ „	1 „ „	
4. „ 16 „ 30 M.	Injektion des Pneumococcus	Injektion des Pneumococcus	Injektion des Pneumococcus
5. „	Tod um 23 Uhr		Tod um 23 Uhr
6. „		Tod um 20 Uhr (21 Std. nach dem Kontrolltier)	

5. Experiment.

Tag	Kaninchen 1	Kaninchen 2	Kontrolltier
1. Tag	10 ccm Aleuron	1 mg Digitalin	
2. „	10 „ „	1 „ „	
3. „	10 „ „	1 „ „	
4. „	10 „ „	1 „ „	
5. „ 18 Uhr	10 „ „	1 „ „	
5. „ 18 „ 30 M.	Injektion des Pneumococcus	Injektion des Pneumococcus	Injektion des Pneumococcus
6. „	Tod um 16 Uhr		Tod um 14 Uhr
8. „		Tod um 19 Uhr (53 Std. nach dem Kontrolltier)	

Ich halte es für überflüssig, zu bemerken, daß die Dosen von Aleuron, Digitalin und virulenter Pneumococcus-Kultur immer im Verhältnis zu dem Gewichte des injizierten Tieres standen, daß bei allen Experimenten immer sogleich nach dem Tode die Sektion gemacht, und daß außer der direkten Blutuntersuchung immer Kulturen angelegt wurden.

Da dies so ist, warum vermag dann die durch Injektion von Aleuron hervorgerufene Leukocytose nicht wenigstens das Leben der infizierten Tiere zu verlängern? Sind vielleicht die Aleuroninjektionen an sich selbst dem Organismus schädlich? Wirkt vielleicht das Digitalin außer der Erzeugung intensiver Leukocytose außerdem günstig auf das Herz oder auf die Nierensekretion? Oder haben endlich die durch Digitalin vermehrten Leukocyten irgend eine andere Eigenschaft, als die durch Aleuron in den Kreislauf eingeführten? Ich kann versichern, daß mit gehörig sterilisiertem Aleuron gemachte Einspritzungen vollkommen unschädlich sind. Zu anderen Experimenten befinden sich in unserem Laboratorium viele Tiere, die lange mit Injektionen von Aleuron behandelt wurden und niemals die geringste Störung zeigten, deren Gewicht niemals abnahm.

Hierauf wendete ich meine Aufmerksamkeit dem Verhalten der Leukocytose zu, wie sie sich bei Tieren äußert, die mit Aleuron oder mit Digitalin behandelt worden sind, nachdem die Injektion des virulenten Materials ausgeführt worden war. Ich führe hier eines der von mir hierüber angestellten Experimente an (p. 211).

Bei Betrachtung dieser Tabelle sehen wir, daß bei dem mit Digitalin behandelten Tiere die Leukocytose mehr als 48 Stunden lang zunimmt, bei dem mit Aleuron behandelten dagegen zwar zu Anfang sehr deutlich, bisweilen sogar auffallender ist, als nach Digitalininjektion, aber plötzlich abnimmt; die Blutuntersuchung zeigt dann viele zerstückelte Leukocyten, die in Zerfall begriffen sind. Auch die vielkernigen finden sich in viel geringerer Zahl bei den mit Aleuronemulsion behandelten Tieren, als bei den mit Digitalin injizierten Kaninchen. Mit einem Worte: Bei den mit Pneumococcus infizierten folgt auf die Leukocytose durch Aleuron (die bei gesunden Tieren lange hoch bleibt) schnelle und starke Zerstörung der Leukocyten. Nun können wir infolge der neuerlichen Untersuchungen Carbone's uns den Grund erklären, warum die Leukocytose durch Aleuronat keinen Einfluß auf den Verlauf der pneumonischen Septikämie ausübt. Nach Carbone — und kürzlich im Laboratorium angestellte Untersuchungen scheinen diese Ansicht zu bestätigen — wäre die Pneumonieinfektion als eine Intoxikation zu erklären, verursacht durch Resorption der Zerfallsprodukte der im Blute kreisenden Elemente durch Wirkung des spezifischen Mikroorganismus. In unserem Falle wurde uns also die starke, bald nach der Pneumococcus-Injektion auftretende Leukocytolysis, die bei den mit Digitalin behandelten Tieren nicht erscheint, den fehlenden Einfluß der Aleuroninjektionen auf den Verlauf der Pneumonieinfektion erklären. Wir müssen wohl annehmen, daß das Digitalin auf den Kreislauf einwirkt und den Leukocyten größere Widerstandskraft gegen den Einfluß des Pneumococcus bewahrt.

Ich habe mir vorgenommen, zu untersuchen, ob man durch künstliche Vermehrung des Widerstandes der Leukocyten auch nach Injektion von Aleuron eine günstige Wirkung hervorbringen könne.

Wenn ich jetzt die Folgerungen aus diesen meinen Untersuchungen ziehe, kann ich sagen:

Kaninchen 1.

Tag	Injektion von Digitalin	Injektion der Pneumokokkenkultur	Zahl der Leukocyten	Bemerkungen
1. Tag	2 mg Digital.			
2. „ 9 Uhr	1 „ „			
2. „ 9 „ 30 Min.		Pneumococc.	9 100	
2. „ 10 „ 30 „			8 230	
2. „ 11 „ 15 „			10 300	
2. „ 14 „			11 200	
2. „ 15 „ 15 „			13 100	
2. „ 17 „			13 600	
3. „ 9 „			12 800	Das Tier scheint gesund.
3. „ 11 „			12 500	
3. „ 15 „			12 100	
3. „ 17 „			11 900	
4. „ 9 „			10 000	
4. „ 11 „			8 100	
4. „ 17 „			5 800	Einige Diplokokken bei direkter Untersuchung.
4. „ 19 „			2 350	Tod.
4. „ 21 „				

Kaninchen 2.

Tag	Injektion von Aleuron	Injektion von Kultur des Pneumococc.	Zahl der Leukocyten	Bemerkungen
1. Tag	10 ccm Aleur.			
2. „ 9 Uhr	10 „ „			
2. „ 9 „ 30 Min.		Pneumococc.	8 600	
2. „ 10 „ 30 „			9 100	
2. „ 11 „ 15 „			12 500	
2. „ 14 „			12 000	
2. „ 15 „ 15 „			10 700	Einige Leukocyten in Zerfall (vielkernige).
2. „ 17 „			8 000	Viele Leukocyten in Zerfall.
3. „ 9 „			4 200	Diplococcus im Kreislaufe. Leukocytolysis.
3. „ 11 „			2 400	Tod.
3. „ 12 „				

1) daß, wie Gazza gezeigt hat, auf Injektion von Digitalin starke Leukocytose folgt;

2) daß mit Digitalin behandelte Tiere viel länger am Leben bleiben, als die Kontrolltiere;

3) daß Injektionen von Aleuron zwar deutliche Leukocytose hervorrufen, aber den Verlauf der Pneumonieinfektion durchaus nicht beeinflussen;

4) daß die Hyperleukocytose nach Digitalininjektion bei mit Pneumococcus infizierten Tieren sich viel länger erhält, als die durch Aleuron hervorgerufene;

5) daß auf die Aleuronleukocytose schnelle und starke Leukocytolysis folgt.

6) Es ist logisch, anzunehmen, daß die Digitalis außer ihrem leukocytären Vermögen bei Pneumonieinfektion auch durch ihre Wirkung auf Herz und Gefäße günstig wirkt.

7) Der gleichzeitige Tod der mit Aleuron behandelten und der

Kontrollkaninchen rührt wahrscheinlich von der Resorption des aus dem Zerfall der Leukocyten herrührenden toxischen Materials her.

Bei der Wichtigkeit des Gegenstandes besonders für die modernen Theorieen über Immunität und Entstehung baktericider und antitoxischer Substanzen habe ich eine Reihe von Untersuchungen angestellt, um eingehender die Erscheinungen zu studieren, welche infolge der gegenseitigen Einwirkung der Leukocyten und ihrer Produkte auf die septikämischen Bakterien und dieser auf die Elemente des Organismus eintreten.

Turin, 10. Mai 1902.

Litteratur.

Rieder, Münch. med. Wochenschrift. 1892.
Limbeck, Grundriß einer klinischen Pathologie des Blutes. Jena 1892.
Sadler, Fortschritte d. Med. 1892.
Loeper, Archives de médecine expér. et d'Anat. path. 1899.
Schloesinger, Zeitschr. f. Hygiene. Bd. XXX. fl. 1.
Noegeli-Akerblom, Centralbl. f. innere Med. 1895.
Motta Coco, Contributo allo studio della iperleuc. e leucocitolisi nell' infez. diploc. sperim. (Riforma med. Anno XIV. 1898. Vol. IV.)
Gazza, Leucocitosi digitalica e sua importanza nella diplococcemia sperim. (Riforma med. Vol. IV. 1901.)
Carbone, Atti dell' Accademia delle scienze di Modena. 1892.
Lucatello, VII Congresso Società Italiana di medicina interna. Roma 1896. Ott.

Diplococcus pneumoniae bei chronischer Bronchitis.

[Aus dem bakteriologischen Laboratorium des Militärhospitals zu Kiew.]

Von Dr. med. **D. Gromakowsky.**

Bei der mikroskopischen Untersuchung vom Sputum chronischer Bronchitiskranker findet man in den meisten Fällen den Diplococcus pneumoniae. Daß letzterer nicht aus dem Speichel in das Sputum gerät, sieht man daraus, daß er auch nach dem Abspülen des frisch gesammelten Sputums mit sterilisiertem Wasser in demselben nachzuweisen ist.

Die Anwesenheit des Diplococcus im Sputum giebt noch keinen Anlaß, seine Virulenz zu behaupten, da letztere, wie bekannt, stark variieren kann. Wir fanden es nicht für zweckmäßig, den Pneumococcus in reiner Kultur zu bekommen, um dann seine Virulenz bestimmen zu können, da dieser Mikroorganismus in Kulturen rasch seine Virulenz verliert.

Um die Virulenz der Pneumokokken zu bestimmen, wurden daher mehreren Kaninchen aus frisch gesammeltem Sputum subkutane Injektionen gemacht, um bei ihnen eine Pneumokokkenseptikämie hervorzurufen, wie es bei Injektionen von Sputum bei Pneumonia crouposa, die durch Pneumokokken verursacht ist, der Fall ist. Dieses Verfahren wurde von Gamaleia zu diagnostischen Zwecken empfohlen.

Trotz des Gehaltes von Pneumokokken hatte das Sputum von zehn an chronischer Bronchitis Kranken im Quantum von 1—$1^1/_2$ ccm Kaninchen subkutan eingespritzt, bei letzteren keine Septikämie hervorgerufen.

Wenn wir dagegen frisch gesammeltes Sputum mit Bouillon in einem Probiergläschen im Verhältnisse von 1 : 3 vermischten, dann das Probiergläschen auf 24 Stunden in den Thermostaten bei 37° stellten und alsdann 1 ccm davon Kaninchen unter die Haut spritzten, so gingen dieselben in den meisten Fällen an Pneumococcus-Septikämie zu Grunde.

Wenn man das Sputum 24 Stunden im Thermostaten stehen läßt, so vermehren sich in demselben die Pneumokokken auf Kosten anderer Mikroorganismen, was sich durch den Vergleich von Agarplatten, die mit frischem Sputum und solchen, die mit 24 Stunden in Thermostaten gestandenem Sputum besät waren, feststellen läßt.

Die Versuche an dem Kaninchen wurden mit Sputum von 33 Kranken gemacht. Positive Resultate gaben 23 Fälle, bei welchen die Tiere umkamen. Im Blute und in den inneren Organen wurden die Pneumokokken in großer Anzahl vorgefunden. Diese Tiere (Kaninchen von ungefähr 500 g) gingen gewöhnlich 24 oder 48 Stunden nach der Injektion ein, nur 6 starben am 3. Tage.

Die Kranken, deren Sputum wir untersuchten, litten an einer typisch primären chronischen Bronchitis; es waren alle Soldaten im Alter von 21—22 Jahren.

Bei der bakteriologischen Untersuchung des Sputums wurden in diesen eben erwähnten Fällen noch folgende pathogene Mikroorganismen gefunden: 1) Staphylococcus pyogenes albus und aureus fast in allen Fällen (derselbe erzeugte bei subkutaner Injektion bei Kaninchen Abscesse). 2) In einigen Fällen Bac. Friedlaenderi und Streptococcus pyogenes.

Da in allen Fällen von chronischer Bronchitis, wo der virulente Pneumococcus zu finden ist, sich im Sputum auch andere pathogene Mikroben finden, ist es selbstverständlich schwer, zu entscheiden, welcher von diesen Mikroorganismen wohl diese Erkrankung verursachen kann. Auf Grund des Angeführten können wir folgende Schlüsse ziehen: 1) Der virulente Pneumococcus kommt im Sputum an primärer chronischer Bronchitis Kranker fast ebenso oft vor, wie bei croupöser Pneumonie. 2) Das Sputum bei chronischer Bronchitis verursacht bei Kaninchen eine Septikämie nur in dem Falle, wenn es vorher 24 Stunden im Brutschranke gestanden hat.

Ueber die bei den Hornhautvaccineherden vorkommenden Zelleinschlüsse.

[Aus den „Laboratori di Sanità Pubblica“ zu Rom.]

Dritte vorläufige Mitteilung.

Von Privatdocent Dr. med. C. **Gorini.**

Mit 2 lithographischen Tafeln.

(Schluß.)

Nachdem ich bis zu diesem Punkte gekommen war, habe ich mir die Frage vorgelegt, ob die coccusförmigen Körperchen nicht bakterischer Natur sein könnten?

Wenn man sich, wie hier, in Gegenwart nukleärer Veränderungen befindet, ohne die Bestätigung durch künstliche Reinkultur liefern zu können und ohne die Möglichkeit, die Entwickelung des vermutlichen Parasiten im lebenden Organismus verfolgen zu können, noch auch eine spezifische Färbung benutzen zu können, so muß man jedenfalls beim Urteile sehr vorsichtig sein. Auch neuerdings lehrte Borrel[1]) gepaarte und selbst wie Streptokokken kettenartig verbundene coccusförmige Körperchen kennen, welche durch die Entwickelung eines normalen Bestandteiles der Zellen (Archoplasma vel Idiosoma) entstanden waren.

Betreffs der oben erwähnten Frage werde ich mich daher darauf beschränken, in Erwägung zu ziehen, daß die Regelmäßigkeit und die Gleichförmigkeit der bei den anfänglichen vaccinischen Herden angetroffenen coccusförmigen Körnchen und ihre Anwesenheit auch in den normalen, mit scheinbar ruhendem Kerne versehenen Zellen zu Gunsten eines cellulären Ursprunges, meiner Meinung nach, nicht spricht, während ein solcher Ursprung bei anderen Körnchen wahrscheinlich erscheint (siehe z. B. die Körnchen *xx* in Fig. 3). Sonderbar ist übrigens die Thatsache, daß die coccusförmigen Körnchen sich nur im Epithel finden, während sie im corneellen Bindegewebe ganz fehlen; diese Sitzbegrenzung, welche zwar mehr den Protozoen als den Bakterien eigen ist, trifft mit dem zusammen, was man bezüglich der Cytoryctes beobachtet, und mit der überhaupt angenommenen Meinung, daß der Vaccineerreger die epithelialen Gewebe wesentlich affiziert.

* * *

Wenn wir auch von ihrer Natur absehen, bleibt immer noch die Frage nach den Beziehungen der coccusförmigen Körnchen zu den Cytoryctes und zu der vaccinischen Infektion eine offene.

Auch betreffs dieser Frage werde ich mich vorläufig auf einige Betrachtungen beschränken, mir vorbehaltend, auf das Problem zurückzukommen, sobald ich eine größere Menge von Beobachtungen gesammelt haben werde.

A. In Hinsicht der Beziehungen zu den Cytoryctes kann ich sagen:

1) Die coccusförmigen Körnchen erscheinen vor dem Auftreten der Cytoryctes und sind von Erscheinungen von Kernhyperaktivität begleitet, wie typischer und atypischer Karyokinese, vielgestaltigen Kernen, mehrfachen und zusammengesetzten Kernen, fragmentierten Kernen, mit Knospen und Einschlüssen versehenen Kernen, Kernen mit austretendem Chromatin (siehe Fig. 1, 2 u. 3) etc.

2) Mit dem Auftreten der Cytoryctes vermindern sich nach und nach die coccusförmigen Körnchen bis zum völligen Verschwinden aus den Herden.

Auf Grund dieser beiden Thatsachen kann man annehmen, entweder daß die Cytoryctes aus den Körnchen durch eine weitere Evolution dieser letzteren herstammen oder auch, daß die Cytoryctes das Produkt von nukleären Veränderungen sind, welche durch die coccusförmigen Körnchen verursacht werden.

---

1) Borrel, Théories parasitaires du cancer. (Annal. de l'Inst. Pasteur. T. XV. 1901. p. 49. Av. 3 pl.)

B. Hinsichtlich der wahrscheinlichen Beziehungen der coccusförmigen Körnchen zu der vaccinischen Infektion kann ich sagen:

1) Die von mir angewandte Methode der Klatschpräparate aus den aseptischen Vaccineplatten bietet die meiste Garantie, sowohl um eine erschöpfende mikroskopische Untersuchung der unzweifelhaft sterilen Vaccine durchzuführen, wie auch um die Ueberzeugung zu erwerben, daß die coccusförmigen Körnchen, sowie die Cytoryctes ein Produkt der aktiven Vaccine und nicht fremder kultivierbarer Keime sind, welche die Vaccine enthält.

Selbstverständlich muß man aber, um diese Methode mit Vorteil anwenden zu können, über Lymphen verfügen, welche ziemlich rein oder, um es besser zu sagen, schon zum Teil steril und noch ziemlich wirksam sind. Nach meiner Erfahrung ist eine solche Vereinigung von Eigenschaften nicht so leicht bei den auf gewöhnliche Weise bereiteten Lymphen anzutreffen.

2) In 3 aktiven Vaccinen verschiedener Herkunft, die ich bisher mittels oben genannter Methode zu untersuchen Gelegenheit hatte, waren die beschriebenen coccusförmigen Körperchen in solcher Menge enthalten, daß die Wirksamkeit jener Materialien selbst bei minimaler Dosis ihnen zugeschrieben werden konnte, während die paranukleären Körperchen (vermutlich Cytoryctes?) in großer Minorität sich darin vorfanden.

3) In einer mittels oben genannter Methode untersuchten inaktiven Vaccine habe ich keine der beschriebenen coccusförmigen Körperchen gefunden.

Hier halte ich es aber für noch nötig, darauf aufmerksam zu machen, daß man sich hüten muß, eine Lymphe als unwirksam zu betrachten, denn schon mehrmals kam es mir vor, daß ich eine schwache, aber entschieden positive corneelle Reaktion durch Vaccine erhielt, welche für ganz unwirksam auf Rinder erklärt worden war. Dies ist ein weiterer Beweis für die Vorzüglichkeit der Methode der Hornhautimpfungen bei den Kaninchen für die biologische Kontrolle der Vaccinelymphe.

Rom, März 1901.

Anhang.

Bemerkungen über einige nach meiner Mitteilung erschienene Arbeiten.

A. Funck, M., Der Vaccine- und Variolaerreger. (Centralbl. f. Bakt. etc. 1. Abt. Bd. XXIX. p. 921.)

In dieser interessanten Arbeit schreibt Funck die ätiologische Bedeutung der Vaccine schlechterdings jenen vereinzelten (Sporen?) und gruppierten (Cysten?) Körnchen zu, auf welche seit Chaveau alle Forscher hingewiesen haben, die das vaccinische Pus mikroskopisch untersuchten, ohne aber über ihre Natur ein entscheidendes Urteil zu fällen.

Funck gründet seine Beurteilung wesentlich auf die Thatsache, daß die vermuteten parasitären Cysten, welche unter dem Mikroskope bei schwacher Vergrößerung (AA, Ok. 2 Zeiss) aus Platten von sterilem Vaccin genommen und auf die Haut der Rinder inokuliert werden, charakteristische und immunisierende Pusteln erzeugen.

Wäre dies genügend, so könnte ich behaupten, mindestens gleichzeitig mit Funck zur Lösung der Frage gekommen zu sein.

In der That habe ich, wie man aus meiner gegenwärtigen Mitteilung ersieht, gefunden, daß man, wenn man eine auf Agarplatten ausgebreitete Lymphe 3 Tage lang im Thermostaten bei 35—37° hält und nachher mit den steril gebliebenen Saatportionen die Kaninchenhornhäute inokuliert, die makroskopische und mikroskopische klassische vaccinische Alteration wieder hervorbringt.

In jenen Saatportionen sieht man bei schwacher Vergrößerung eben nichts als isolierte oder grüppierte sporenähnliche Bildungen (siehe die Körper *dd* meiner Fig. 4, welche den Funck'schen Figuren von Sporen [?] und Cysten [?] entsprechen). Aber ich habe ferner bewiesen, daß, wenn man mit jenen Saatportionen Klatschpräparate fertigt und diese bei starker Vergrößerung beobachtet, noch viele andere Objekte (tetracoccusförmige Körnchen, vermutliche Kernreste etc., cfr. dieselbe Fig. 4) hervortreten.

Und nun? Was für Kriterien besitzen wir, um den einen eher als den anderen Elementen einen ätiologischen Wert zuzuschreiben?

Aber noch eine Thatsache habe ich konstatiert. Auch das Abkratzungsmaterial von vaccinierten Hornhäuten, welches 3 Tage lang bei 35—37° C auf Agarplatten ausgebreitet blieb, ohne sich zu entwickeln, behielt seine Wirksamkeit auf den Kaninchenhornhäuten (Gorini IV). Sollte ich daraus ohne Vorbehalt schließen, daß die in jenem Abkratzungsmaterial enthaltenen Cytoryctes Guarnieri die Parasiten der Vaccine sind?

Ich halte mich dazu nicht für autorisiert und will hier wiederholen: Wenn man sich, wie hier, in Gegenwart nukleärer Veränderungen befindet, ohne die Bestätigung durch künstliche Reinkultur liefern zu können und ohne die Möglichkeit, die Entwickelung des vermutlichen Parasiten im lebenden Organismus verfolgen zu können, noch auch eine spezifische Färbung benutzen zu können, so muß man jedenfalls beim Urteilen sehr vorsichtig sein.

B. Calmette et Guérin, Recherches sur la vaccine expérimentelle. (Annal. de l'Inst. Pasteur. T. XV. 1901. p. 161.)

Die Schlußfolgerungen dieser wichtigen Arbeit von C. und G. veranlassen mich, einige Betrachtungen auszuführen, die ich aus meinen Studien über Vaccine herleite.

I. Biologische Kontrolle der Vaccine.

C. und G. schlagen vor, die Vaccine durch Hautimpfungen an Kaninchen zu kontrollieren. In dieser Hinsicht haben sie wahrgenommen: a) daß reichlichere und typischere Ausschläge erhalten werden, wenn die Vaccine einfach auf dem frisch rasierten Derma ausgebreitet wird, ohne andere epidermische Läsionen, außer jener ganz oberflächlichen, zu machen, die von der Schneide des Rasiermessers erzeugt werden; b) daß der Hautausschlag bei Kaninchen binnen 3 Tagen zur vollständigen Entwickelung gelangt, so daß man schon am 3. Tage die Virulenz der Vaccine beurteilen kann; c) daß die Kaninchen weniger empfänglich als Rinder und Kinder sind, deshalb bei jenen nur die sehr wirksamen Vaccinen schöne Ausschläge hervorbringen.

Hier sei mir ein Vergleich mit der von mir seit 1898 vorgeschlagenen und in den „Laboratori di Sanità Pubblica“ des Ministeriums des Innern zu Rom angewandten Kontrolle der Vaccine durch Hornhautimpfungen erlaubt. Es kann kein Zweifel sein, daß man auf der Hornhaut keine charakteristischen Vaccinepusteln erhält, wie es auf der Haut der Fall ist; doch kann das Urteil über die Aktivität der Vaccine durch ein geübtes Auge nicht bloß aus den makroskopischen Veränderungen der Hornhaut leicht hergeleitet werden, sondern auch, und mit größerer Zuverlässigkeit, aus der mikroskopischen Wahrnehmung der charakteristischen Zelleinschlüsse, deren Menge und Frühzeitigkeit nach meiner Erfahrung im Verhältnis zur Virulenz der Vaccine steht. Durch mikroskopische Untersuchung des frisch abgeschabten Epithels in Saffraninlösung (cfr. die in meiner Arbeit V beschriebene Abkratzungsmethode) kann dieses Urteil spätestens am 3. Tage gefällt werden; manchmal aber schon, bei sehr wirksamen Vaccinen, nach nur 24 Stunden.

Ferner besitzt die Hornhautimpfung den Vorzug, ein sehr glaubwürdiges Kriterium auch für die Reinheit der Vaccine zu liefern; dieses Kriterium hat aus einem gewissen Gesichtspunkte einen noch höheren Wert, als jenes der bakteriologischen kulturellen Untersuchung, welche uns wohl die Menge und Art der fremden Keime, nicht aber ihre Virulenz andeutet. Dagegen konnte ich durch die Hornhautimpfung die Anwesenheit selbst von spärlichen pyogenen Bakterien bei einigen Lymphen feststellen, während andere Lymphen, obwohl sie an kultivierbaren Keimen reich waren, eine ganz normale, von entzündlichen Phänomenen nicht begleitete Reaktion erregten; wahrscheinlich weil es sich um saprophytische oder virulenzlose, pathogene Arten handelte.

Lehrreich ist der mir vorgekommene Fall von einer Lymphe, welche bei den Kulturen eine reichliche und fast reine Entwickelung von Staphylococcus aureus gab. Paul's System[1]) nach, welcher die Vaccinen der bakteriologischen Kontrolle unterwirft und nur die Staphylococcus aureus-freien Lymphen dem Publikum liefert, sollte die obengenannte Lymphe sehr streng beurteilt werden. Dagegen gab sie bei Hornhautimpfungen eine ganz normale Reaktion. Dies galt für mich als ein peremptorischer Beweis, daß jener Staphylococcus virulenzlos war. Nichtsdestoweniger wollte ich die Bestätigung durch an 2 Meerscheinchen ausgeführte subkutane, bezüglich intraperitoneale Inokulation sehr großer Mengen von seiner Kultur erlangen; beide Tiere zeigten in der That keine Spur von Krankheit. Deshalb, auf Grund weiterer Erfahrung, kann ich heute nur wiederholen, was ich im Jahre 1898 geschrieben habe: „daß die Abwesenheit von Entzündungserscheinungen **während der 3 ersten Tage** nach der Hornhautimpfung ein triftiges Kriterium einer hinlänglichen Reinheit der Lymphe ist.“

Und wir müssen auch anerkennen, daß wir durch die Bestätigung der Apyogenizität einer Lymphe in den Stand gesetzt werden, nicht nur die Anwendung von unzulänglich in Glycerin gereinigten Vaccinen zu vermeiden, sondern auch ein unnützes und selbst schädliches Altwerden von Lymphen zu verhüten, welche schon ab initio rein genug waren, so daß die verlängerte Aufbewahrung in Glycerin einzig ihre immunisierende Wirkung abschwächt.

1) Paul, G., Ueber rationelle Gewinnung eines reinen animalischen Impfstoffes. (Das österreichische Sanitätswesen. Beilage zu No. 43. 1896. 22. Okt. p. 167.)

Hiernach ist es klar, daß es nicht zulässig ist, ein so sicheres Urteil über die Apyogenizität der Vaccine aus der Hautimpfung abzuleiten, sowohl wegen der Qualität des gefäßreichen und daher frühzeitigen leukocytären Infiltrationen ausgesetzten Gewebes, wie auch wegen der leichten Inquinabilität des Operationsfeldes. Diesen ungünstigen Bedingungen der Haut stehen diejenigen der Hornhaut gegenüber, welche gefäßlos und gegen äußere Verunreinigung sehr gut geschützt ist, so daß bei den zahlreichen Impfungen, die ich mit aseptischen Materialien anstellte, kein Fall von Verunreinigung vorkam.

Uebrigens habe ich schon in Uebereinstimmung mit dem, was C. und G. bezüglich der Hautimpfungen sagen, bei meiner Kontrollmethode aufmerksam gemacht (cfr. meine Arbeit I), daß auch bei den Hornhautimpfungen die makroskopischen und mikroskopischen Resultate reiner und charakteristischer werden, wenn man Bedacht nimmt, oberflächliche Incisionen zu machen, welche bloß das Hornhautepithel interessieren. Das ist ein weiterer Beweis, daß der Vaccineerreger die epithelialen Gewebe wesentlich affiziert.

Was die Empfänglichkeit des Kaninchens für Vaccin betrifft, so komme ich auf der Basis der Hornhautimpfungen zu etwas anderen Folgerungen als C. und G. Lymphen, welche auf der Haut von Rindern und Kindern wenig aktiv waren, gaben mir einen zwar verspäteten und schwachen, aber positiven Erfolg auf der Kaninchenhornhaut. Infolgedessen, während ich einerseits wegen der Ungleichheit der Impflokalität keinen merklichen Empfänglichkeitsunterschied zwischen Kaninchen und Rindern bezw. Menschen annehmen würde, leite ich andererseits daraus einen neuen Beweis für die Behauptung ab, daß die Probe der Wirksamkeit der Lymphe durch die Hornhautimpfungen sehr delikat und streng ausfällt; denn man kann dadurch nicht nur die absolute Inaktivität (vermißte corneelle Reaktion), sondern auch eine mangelhafte Virulenz (verspätete und schwache corneelle Reaktion) der Vaccine feststellen.

II. Vermehrung des Vaccineerregers.

Aus ihren Untersuchungen über die Lokalisation des vaccinischen Virus in den verschiedenen Organen des Kaninchens leiten C. und G. den Schluß ab, daß „die Vermehrung der virulenten Elemente des Vaccins beim Kaninchen in keinem anderen Organ außer der Haut sich zu vollziehen scheint“.

In dieser Beziehung möchte ich daran erinnern, daß die Studien über die vaccinische Infektion der Hornhaut, welche von Guarnieri angefangen und von mehreren Forschern fortgesetzt wurden [cfr. die meiner Arbeit[1]) beigefügte Bibliographie], zu der Annahme führen, daß das vaccinische Virus sich auch auf der Kaninchenhornhaut züchten läßt.

Wäre die parasitäre Natur der Cytoryctes vaccinae außer Zweifel, so würden keine anderen Beweise erforderlich sein, um zu demonstrieren, daß in dem Hornhautepithel eine lebhafte Vermehrung des Contagium animatum erfolgt. Nichtsdestoweniger, selbst wenn man von der noch unbestimmten Bedeutung der Cytoryctes abstrahiert, bleibt immer die Thatsache bestehen, daß man durch die Hornhautimpfung einer minimalen Vaccinedosis einen pathologischen Prozeß des Hornhautepithels hervorbringt, welcher einen typischen und kon-

---

1) Pfeiffer, E., Ueber die Züchtung des Vaccineerregers etc. (Centralbl. f. Bakt. etc. Abt. I. Bd. XVIII. 1895. p. 769.)

stanten Evolutionscyklus besitzt und von einem zum anderen Kaninchen, bezw. von einer in die andere Hornhaut übertragbar ist [E. Pfeiffer[1]), Salmon[2]), Wasielewski[3]), Gorini II u. A.].

Einigen Autoren gelang es auch, mit dem Materiale von vaccinierten Kaninchenhornhäuten Impfpusteln auf der Rinder- bezw. Kinderhaut hervorzubringen [Guarnieri[4]), E. Pfeiffer u. A.].

Meinerseits habe ich bereits gezeigt, daß das corneelle Virus, ebenso wie das kutanelle, im Glycerin seine Wirksamkeit bewahren kann, und daß das Abkratzmaterial von vaccinierten Hornhäuten nach 73 Tagen in Glycerin sein Uebertragbarkeitsvermögen auf andere Kaninchenhornhäute beibehalten hatte (II). Heute kann ich hinzufügen (IV), daß ich mit dem Abkratzmateriale von vor 6 Tagen vaccinierten Hornhäuten, welches 15 Tage lang in Glycerin im Refrigerator (ca. 10° C) konserviert war, nicht nur die Reproduktion der corneellen Veränderungen bei einem Kaninchen erlangte, sondern auch die Bildung von 2 typischen Impfpusteln an je 2 erstvaccinierten Kindern erreichte, welche durch Anlegung von je 3 Impfschnitten in der üblichen Weise am Oberarme geimpft worden waren. Ferner habe ich mit dem Abkratzmateriale von vor 4 Tagen vaccinierten Hornhäuten, welches in Glycerin 24 Stunden lang bei Zimmertemperatur (10—15° C) konserviert war, 10 erstvaccinierte Kinder durch Anlegung von je 3 Impfschnitten geimpft; es ergaben sich bei allen positive Resultate, nur bildete sich bei 2 Kindern nur eine einzige Pustel[5]).

Ich kann nicht leugnen, daß auch bei mir wie schon bei anderen Forschern [Bossalino[6]) u. A.] nicht alle Uebertragungen positiv ausfielen; nach meiner Ansicht aber, da die Mißerfolge einen plausibeln Grund sowohl in den Virulenz- und Empfänglichkeitsverschiedenheiten wie auch in den technischen Schwierigkeiten der Impfung von solchem Materiale finden, genügen selbst wenige Erfolge von sorgfältig ausgeführten Versuchen, um sich zu überzeugen, daß das Vaccinevirus in der Kaninchenhornhaut sich vermehrt. Es kann auch nicht der Verdacht bestehen, daß die Aktivität des corneellen Materials durch die kleine Portion der angewandten, an der Impfstelle zurückgebliebenen Lymphe bedingt werde. Sollte das Vaccin auf der Hornhaut sich nicht entwickeln, so ist es klar, daß im Laufe von 3 oder mehreren Tagen die spärlich inokulierten virulenten Elemente hinlänglich Gelegenheit haben würden, sich zu eliminieren, ebenso wie in der That, nach meiner Erfahrung, andere Materialien inkl. der in der Vaccine selbst enthaltenen fremden Keime sich rasch eliminieren (s. unten bezüglich Reinigung der Vaccine).

Endlich konnte ich auch beobachten, daß man durch die einfache

1) Pfeiffer, E., Ueber die Züchtung des Vaccineerregers etc. (Centralbl. f. Bakt. etc. Abt. I. Bd. XVIII. 1895. p. 769.)

2) Salmon, Recherches sur l'infection dans la vaccine et la variole. (Ann. de l'Inst. Pasteur. T. XI. 1897. p. 289.)

3) Wasielewski, V., Ueber die Form und Färbbarkeit der Zelleinschlüsse bei Vaccineimpfungen. (Centralbl. f. Bakt. etc. Abt. I. Bd. XXI. 1897. p. 901.)

4) Guarnieri, Ulteriori ricerche sulla etiologia e patogenesi della infezione vaccinica. (Clinica moderna. Vol. III. 1897.)

5) Sämtliche Kinderimpfungen wurden von mir im Institute für die öffentliche Vaccination der Stadt Rom ausgeführt. Für die mir gütigst gestattete Hospitalität danke ich Herrn Prof. Dr. T. Gualdi, Direktor des dortigen städtischen Gesundheitsamtes, und Dr. L. Angelici, Impfarztchef, bestens.

6) Bossalino, Intorno alle infezioni vacciniche della cornea. (Archivio per le Scienze mediche. Vol. XXII. 1898. p. 273.)

Hornhautimpfung (ohne Penetration in die vordere Augenkammer) selbst Immunität hervorrufen kann. Mit einer und derselben Lymphe, welche sich auf den Hornhäuten aktiv gezeigt hatte, impfte ich auf die Haut nach Calmette's System 6 Kaninchen, von denen 3 vor 8 Tagen auf den Hornhäuten vacciniert worden waren, und 3 noch ganz frisch (Virgines) waren. Das Ergebnis war das folgende: Von den 3 frischen Kaninchen bot 1 einen schönen Hautausschlag zwischen dem 3. und 4. Tage dar; bei den 2 anderen war der Ausschlag dem Aussehen nach wenig deutlich, aber beim Tasten, indem ich die Haut in Falten aufhob, konnnte ich eine beträchtliche kutanelle Verdickung feststellen [1]). Dagegen zeigte sich bei allen 3 an den Hornhäuten vorgeimpften Kaninchen die Haut ganz normal sowohl beim Sehen als beim Tasten.

III. Reinigung der Vaccine.

C. und G. haben bemerkt, daß „man aseptische, d. h. bei den Kunstkulturen keimfreie Vaccine bekommen kann, wenn man sie einige Stunden lang in der Peritonealhöhle von Kaninchen hält, die durch eine vorherige peritoneale Bouillonimpfung vorbereitet worden ist. Die Leukocyten lassen dann die fremden Keime verschwinden, während sie die virulenten Vaccineelemente länger schonen".

Eine ähnliche überraschende Reinigung der Vaccine habe ich mehrmals durch die Hornhautimpfungen bestätigt, indem ich Kulturversuche mit dem Abkratzmateriale von Hornhäuten anstellte, welche 1—3 Tage vorher mit Lymphen geimpft worden waren, die sich sehr reich an kultivierbaren Keimen zeigten. Die Kulturen blieben ganz oder fast ganz steril, während die Epithelfetzen, welche auf den Agarplatten 2—3 Tage lang bei ca. 37° C steril geblieben waren, noch fähig waren, die vaccinische Veränderung auf anderen Kaninchenhornhäuten zu erzeugen. Ich habe aber beobachtet, daß die Reinigung ausblieb, wenn die Vaccine virulente pyogene Keime enthielt. In diesem Falle entwickelten sich auf den Kulturen, welche mit Fetzen von Hornhautphlegmonen hergestellt wurden, in großer Menge Staphylococcus aureus und albus, B. coli etc. Es ist daher zu vermuten, daß auch die endoperitoneale Reinigung nicht für diejenigen Lymphen brauchbar ist, welche durch virulente pyogene Keime verunreinigt sind.

In Wahrheit sollte bei einer lege artis gefertigten Lymphe (wie die mir von Dr. Calmette für meine Untersuchungen gefälligst gesandten Lymphen) eine solche Verunreinigung nicht vorkommen. Nichtsdestoweniger, um jede Unsicherheit auszuschließen, halte ich es für jetzt angezeigt, die Leoni'sche Methode der Reinigung in Glycerin nicht zu verlassen, obwohl ihre Wirksamkeit keine absolute ist, so daß es [wie ich schon bemerkt habe (s. oben) und wie C. und G. selbst erläutern] sehr schwierig ist, über Vaccine zu verfügen, welche aktiv und gleichzeitig völlig steril auf den Nährböden ist.

* * *

1) In dieser Beziehung scheint es mir geeignet, folgenden Schluß von Denier, La vaccine chez le lapin etc. (Ann. de l'hyg. publ. et de méd. légale. T. XLVI. 1901. p. 356) hier zu übersetzen: „Der normale vaccinische Hautausschlag beim Kaninchen ist nicht so charakteristisch wie beim Menschen und Rinde. Außer einem einzigen Mal habe ich überhaupt keine charakteristischen Pusteln erhalten. Die Haut spaltet sich, zerspringt und es entsteht eine krustige Bildung über dem ganzen Impffelde."

Schließlich scheint es mir am Platze, den interessanten Schlußfolgerungen von Calmette und Guérin folgende Betrachtungen gegenüberzustellen:

1) Die biologische Kontrolle der Vaccine vermittelst der Hornhautimpfungen bietet gegenüber der Methode der Hautimpfungen den Vorteil, gleichzeitig und in kurzer Zeit nicht nur die Virulenz, sondern auch die relative Reinheit, nämlich die Abwesenheit von pyogenen Keimen, gründlich festzustellen;

2) der Vaccineerreger kann, außer auf der Haut, auch auf der Hornhaut oder (genauer gesagt) auf dem vorderen Hornhautepithel des Kaninchens gezüchtet werden;

3) die Aufbewahrung in Glycerin ist noch immer das sicherste Mittel, über welches wir für eine befriedigende Reinigung der Lymphe verfügen können.

C. von Wasielewski, Beiträge zur Kenntnis des Vaccineerregers. (Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. Bd. XXXVIII. 1901. p. 212.)

Bezüglich dieser sorgfältigen und umfangreichen Arbeit, welche in vielen Punkten mit meinen Resultaten übereinstimmt, sei mir erlaubt, die beiden folgenden Erwägungen hier zu machen:

1) Nachdem W. berichtet hat, daß die kleinsten Cytoryctes nicht der Kernwand anzuliegen brauchen, sondern frei im Cytoplasma, ja mehr in der Zellenperipherie gefunden werden können, sagt er (p. 227): „Ich kann mich deshalb nicht der Auffassung Gorini's anschließen, welcher in den nahen Beziehungen der Vaccinekörperchen zum Zellkern eine ihrer charakteristischen Eigenschaften erblickt."

Dies ist nicht genau meine Auffassung.

Das Vorkommen von Cytoryctes im peripheren Teil von Epithelzellen habe auch ich wahrgenommen. Ich behaupte bloß (p. 235 meiner Arbeit II): „daß die Cytoryctes nur dann als charakteristische Gebilde zu betrachten sind, wenn sie besondere Beziehungen zu den Epithelkernen zeigen. Falls solche Beziehungen nicht vorhanden sind" (und dies ist der Fall bei den in der Zellperipherie liegenden Cytoryctes), „besitzen wir meiner Meinung nach keinen Anhaltspunkt, um einen Cytoryctes von irgend einem endocellulären, nicht vaccinischen Körperchen zu unterscheiden."

2. W. weist nicht nur die Hypothese der Abstammung der Vaccinekörperchen vom Epithelzellkern zurück, sondern auch die von mir aufgestellte Möglichkeit, daß die Cytoryctes, falls sie Zellschmarotzer sind, „auch den Kern der Epithelialzellen angreifen (p. 592 meiner Arbeit III).

W. fügt aber hinzu (p. 265), daß „ein sicheres Urteil wird sich hierüber erst fällen lassen, wenn Gorini die in Aussicht gestellten Abbildungen veröffentlicht haben wird."

Dies ist auch meine Meinung. Und deshalb habe ich die Arbeit III mit zwei Tafeln, und die gegenwärtige Arbeit mit anderen zwei Tafeln versehen, damit man die Schwierigkeit schätzen kann, der man in Gegenwart so vieler und mannigfaltger nukleärer Veränderungen begegnet, wenn man ein entscheidendes Urteil fällen will.

Erklärung der Abbildungen.
(Tafel I und II.)

Sämtliche Präparate sind durch Delafield's Hämatoxylin gefärbt worden.

Alle Figuren wurden mit dem Mikroskope (Tubuslänge 160 mm, Oc. com. 4, Obj. imm. om. semiapochr. 1/18 Koritska) ausgeführt.

Fig. 1, 2 und 3. Querschnitte von anfangenden vaccinischen Hornhautherden des Kaninchens (18—22 Stunden nach der Impfung).

aaa = Coccusförmige, vom Epithel begrenzte Körnchen, welche in den Fig. 1 u. 2 wie aus einem einzigen Elemente gebildet erscheinen, während sie in Fig. 3 sich als Aggregate von 2, 3 oder (am meisten) 4 Elementen erweisen (tetragenus-ähnliche Körnchen).

bbb = Kerne mit austretendem Chromatin.

cc = Mehrfache und zusammengesetzte Kerne.

xx = Beispiel von Körnchen, welche von anderer Natur als diejenige der Körnchen *aa* sind.

Fig. 4. Klatschpräparat von sterilem aktiven Vaccin (zusammengruppierte Zellen).

aaa = Coccus tetragenus-ähnliche Körnchen.

b = Vermutlich Bakterienleichen (?).

c = Paranukleäres Körperchen (vermutlich Cytoryctes?).

ddd = Funck'sche vermutete sporozoäre Formen (?).

Untersuchungen über die keimtötende und entwickelungshemmende Wirkung des Lysoforms.

[Aus dem hygienischen Institut zu Greifswald.
Direktor: Geheimrat Loeffler.]

Von **Otto Seydewitz.**

Zu der Zeit, als die vorliegenden Versuche begonnen wurden, lagen über die desinfektorische Kraft des Lysoforms ganz wenige bakteriologische Untersuchungen vor. Gleichwohl hatte dasselbe schon damals in der Praxis eine ziemlich ausgedehnte Anwendung gefunden. Es erschien daher wünschenswert, den Wert des Mittels einer eingehenden experimentellen Prüfung zu unterziehen.

Lysoform ist eine klare, gelbliche Flüssigkeit von dickflüssiger Beschaffenheit, welche deutlich nach Formalin riecht. Der Formalingeruch wird jedoch verdeckt durch einen aromatischen Geruch, welcher bei geringeren Konzentrationen allein wahrnehmbar ist. Es löst sich in Leitungs- wie in destilliertem Wasser mit einer leicht milchigen Trübung. Beim Stehen der Lösungen bildet sich ein weißer Bodensatz.

Nach Angabe der Lysoformgesellschaft besteht das Lysoform aus 7,2—8 Proz. Formaldehyd bezw. 18—20 Proz. Formalin und Seife mit einem geringen Zusatz eines in Alkohol gelösten ätherischen Oeles. Durch ein besonderes Verfahren wird der Formaldehyd an das Seifenmolekül gebunden und geht mit diesem eine komplizierte chemische Verbindung ein. Dadurch sollen die unangenehmen Eigenschaften desselben, der stechende Geruch und die eiweißfällende, gerbende Wirkung zum größten Teil aufgehoben werden, während die desinfektorische Kraft nicht beeinflußt wird.

Um ein Urteil über das Lysoform zu gewinnen, wurde einerseits sein Abtötungsvermögen für Aussaaten und Kulturen pathogener

b
b
a
b
a
a

Fig. 1.

a
b
b
c
a

Fig. 2.

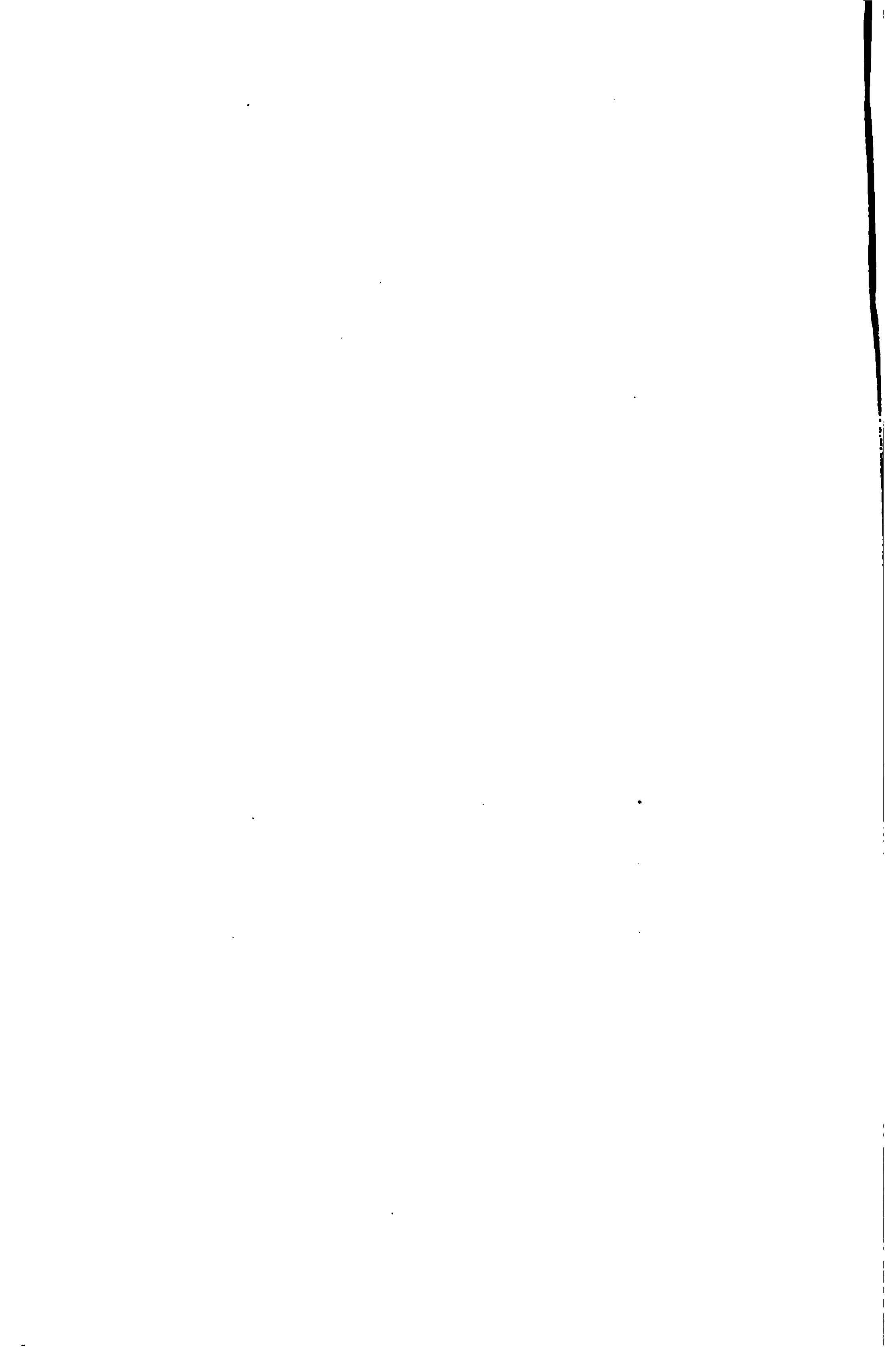


Fig. 4.

Fig. 3.



Organismen auf festen und in flüssigen Nährböden und andererseits seine entwickelungshemmende Wirkung in flüssigen Nährböden geprüft.

Als Testobjekte dienten:

Staphylococcus pyogenes aureus,
Typhusbacillus von einem in der Greifswalder medizinischen Klinik ad exitum gekommenen Falle,
Bacterium coli,
Milzbrandsporenfäden,
Cholera-vibrio Hamburg,
Diphtheriebacillus,
Streptococcus pyogenes, von einem letal verlaufenen Falle von Puerperalfieber gewonnen.

Das Lysoform gelangte in 1—4-proz. Lösungen zur Anwendung, da diese für die Praxis empfohlen worden sind. Die zu jedem Versuche mit destilliertem Wasser frisch hergestellten Lösungen enthielten in je 100 ccm 1—4 ccm Desinficienz.

Die baktericide Kraft Aussaaten von pathogenen Bakterien gegenüber stellte ich nach der von Loeffler[1]) für die Prüfung der Einwirkung von Desinficienten auf Diphtheriebacillen angegebenen Methode auf folgende Weise fest:

Schräg erstarrte Agar- resp. Blutserumröhrchen wurden mit je einer Oese aus dem Kondenswasser einer 24—48-stündigen Agar- resp. Serum-Kultur besät und gleich darauf mit der betreffenden Lysoformlösung übergossen. Nach einer bestimmten Zeit wurde diese abgegossen. Darauf wurden die Röhrchen in den Brütschrank gestellt. Vor der Aussaat ließ ich von den Serumröhrchen, sowie auch bei einem Teil der Versuche von den Agarröhrchen das Kondenswasser ablaufen, da ja möglicherweise die durch das am Boden des Röhrchens angesammelte Kondenswasser eintretende Verdünnung zu einem falschen Urteil hätte führen können.

Einen nennenswerten Unterschied zwischen den Versuchen mit und ohne Kondenswasser habe ich jedoch nicht konstatieren können.

Die Röhrchen wurden mindestens 8 Tage im Brutapparat belassen und beobachtet, da, wie eingehende Versuche ergaben, die geringen Lysoformmengen, welche an dem Nährboden von der Uebergießung her haften blieben, mehrere Tage noch eine entwickelungshemmende Wirkung ausübten.

Bevor der Versuch abgeschlossen wurde, ließ ich in den Röhrchen, bei welchen die Fläche nicht bewachsen war, das Kondenswasser überlaufen, um die etwa in demselben gewachsenen Keime auf der Fläche zur Entwickelung zu bringen.

Das Resultat dieser Versuche habe ich in Tabelle I zusammengestellt. Da eine Wiedergabe sämtlicher Versuche die Uebersicht erschweren würde, so enthält diese Tabelle nur die Grenzwerte für die Zeiten, in welcher die Abtötung der Aussaaten erfolgte. Gefunden sind diese Zahlen mittels einer großen Anzahl sich unter einander kontrollierender Versuche, welche stets gut miteinander übereinstimmten, wiewohl sie zum Teil zeitlich weit voneinander entfernt angestellt sind.

Bei diesen Versuchen war die schon erwähnte Entwickelungshemmung in eklatanter Weise zu konstatieren. Nach 24-stündigem Verweilen der mit Lysoform behandelten Aussaaten im Brütapparat war

---

1) Zur Therapie der Diphtherie. (Deutsche med. Wochenschr. 1891. No. 10.)

sowohl auf den Agar- wie auf den Serumröhrchen selten etwas von den ausgesäten Keimen aufgegangen, während die Kontrollen bereits üppiges Wachstum zeigten.

In der Regel waren die Kolonieen der ausgesäten Keime erst am 2. oder 3. Tage, in einzelnen Fällen sogar erst am 5. Tage deutlich erkennbar.

Tabelle I.

Desinficiens	Stärke der Lösung	Aussaat auf schräg erstarrtem Agar				Aussaat auf schräg erstarrtem Serum	
		Staphylococcus aureus	Typhusbacillus	Choleravibrio	Bact. coli	Diphtheriebacillus	Streptococcus pyogenes
	1 Proz.	25′ + 26′ 0	25′ + 26′ 0	1′ 25″ + 5′ 0	30′ + 35′ 0	20′ + 25′ 0	5′ + 10′ 0
	2 "	8′ + 10′ 0	2′ + 3′ 0	Moment + 1′ 0	1′ + 3′ 0	2′ + 5′ 0	2′ + 3′ 0
	3 "	2′ + 3′ 0	30″ + 45″ 0	Moment + 1′ 0	1′ + 2′ 0	1′ + 2′ 0	1′ + 2′ 0
	4 "	30″ + 45″ 0	30″ + 45″ 0	Moment + 30′ 0	Moment + 1′ 0	Moment + 1′ 0	Moment + 1′ 0

In allen Tabellen bedeutet:
+ = Wachstum,
0 = kein Wachstum.

Aus Tabelle I geht hervor, daß es gelingt, mit einer 1—4-proz. Lösung die Aussaaten der geprüften Organismen abzutöten. Am widerstandsfähigsten von allen erwies sich der Staphylococcus pyogenes aureus; dann folgten Bact. coli, Diphtheriebacillus, Typhusbacillus, Streptococcus pyogenes und Choleravibrio.

Vergleichen wir kurz die Resultate der verschiedenen Lösungen, so zeigt sich, daß eine 2-proz. Lösung etwa 3—8mal so schnell wirkt wie eine 1-proz.

Der 3-proz. Lösung vermögen die Aussaaten mit Ausnahme des Staphylococcus aureus, der erst in 3′ abgestorben ist, nicht länger als 2′ zu widerstehen, während bei der Einwirkung der 4-proz. Lösung innerhalb 1′ sämtliche Röhrchen steril geworden sind.

Zur Lösung der Frage, in welcher Zeit die Kulturen der Einwirkung des Lysoforms unterliegen, wurde die Widerstandsfähigkeit der Kulturen auf festen wie in flüssigen Nährböden geprüft.

Zunächst legte ich mit je einer Oese aus dem Kondenswasser einer Agarkultur des betreffenden Organismus Kulturen auf schräg erstarrtem Agar und auf Agarplatten an. Die 24—48 Stunden alten, kräftig entwickelten Kulturen wurden mit dem Desinficiens in den oben erwähnten Konzentrationen behandelt. Nach einer bestimmten Zeit wurde die Lysoformlösung abgegossen und darauf erfolgte die Uebertragung je einer Oese der Kultur auf schräg erstarrtes Agar. Es war nicht zu befürchten, daß durch die Mitübertragung des Lysoforms eine Entwickelungshinderung einträte, da durch das Abspülen der Oese im Kondenswasser des zu besäenden Röhrchens eine starke Verdünnung des mit übertragenen Lysoforms bewirkt wurde. Nimmt man das Kondenswasser zu nur $^1/_2$ ccm = 10 Tropfen und 1 Oese zu $^1/_{50}$ Tropfen

an, so ist die Verdünnung einer Oese einer 4-proz. Lösung $= \frac{1}{10.50.25} = \frac{1}{12500}$, d. h. eine so starke, daß, wie aus der nachstehenden Tabelle IV ersichtlich, eine Entwickelungshemmung ausgeschlossen ist. Auf diese Weise wurden Staphylococcus aureus und Typhusbacillus geprüft. Da hierbei weder Staphylococcus aureus noch Typhusbacillus, selbst nicht durch mehrstündige Einwirkung der 4-proz. Lösung geschädigt wurden, so lag bei dem großen Mißverhältnis, das zwischen der Abtötungszeit für Aussaaten und Kulturen bestand, der Gedanke nahe, es handele sich um irgend einen Fehler in der Anordnung der Versuche. Ein solcher konnte umso eher vorhanden sein, als ja sowohl auf schräg erstarrtem Agar, wie auch auf Agarplatten nicht überall gleichmäßiges Dickenwachstum der Kolonieen besteht. Auch ist beim Besäen des Agars mit der Oese ein wenn auch vielleicht nur mikroskopisch erkennbares Einreißen des Agars kaum zu vermeiden.

Um diese vermeintliche Fehlerquelle auszuschalten, benutzte ich für die weitere Prüfung des Staph. aureus und des Typhusbacillus, sowie der anderen Organismen folgendes Verfahren:

Eine ganz gleichmäßige Aufschwemmung einer Agarkultur wurde mit einem L-gebogenen Glasstabe auf einer Agarplatte gleichmäßig verteilt. Die auf diese Weise gewonnenen 24-stündigen gut entwickelten Kulturen wurden mit dem Desinficiens übergossen. Nach bestimmten Zeiten wurden dann je eine Oese der Bakterienmasse in Bouillon und bei Diphtheriebacillen und Streptococcus auch auf schräg erstarrtes Blutserum überimpft. Die Beobachtungszeit erstreckte sich auch hier wieder auf mindestens 8 Tage. Eventuelles Wachstum im Kondenswasser kontrollierte ich durch Ueberlaufenlassen desselben.

Wie bei den Aussaaten, so trat auch hier die entwickelungshemmende Wirkung des Lysoforms deutlich hervor. So wuchs z. B. ein Bouillonröhrchen mit Staph. aur. noch, nachdem es 5 Tage klar geblieben war. Eine Verunreinigung war auszuschließen, da die Agaraussaat eine Reinkultur von Staph. aur. ergab. Sämtliche Kulturergebnisse in Bouillonröhrchen wurden teils durch Agaraussaat, teils durch mikroskopische Untersuchung auf ihre Richtigkeit geprüft.

Die Resultate dieser Versuche enthält die Tabelle II, in der ebenfalls nur die Grenzwerte zusammengestellt sind.

Tabelle II.

Desinficiens	Stärke der Lösung	Agarplattenkulturen. Ueberimpfungen in Bouillonröhrchen						Agarplattenkulturen. Ueberimpfungen auf schräg erstarrt. Serum	
		Staphylococcus aureus	Typhusbacillus	Bact. coli	Cholera Vibrio	Diphtheriebac.	Streptococc.	Diphtheriebacillus	Streptococcus
	1 Proz.	12 St. + 24 „ 0	9 St. + 12 „ 0	9 St. + 12 „ 0	3 St. + 4 „ 0	1 St. 0	1 St. + 3 „ 0	12 St. + 25 1/2 „ 0	5 1/2 St. + 6 1/2 „ 0
	2 „	12 „ + 25 1/2 „ 0	3 „ + 4 „ 0	3 „ + 4 1/2 „ 0	1 „ + 2 „ 0	1 „ 0	1 „ 0	5 1/2 „ + 6 1/2 „ 0	3 „ + 4 1/2 „ 0
	3 „	6 1/4 „ + 9 „ 0	1 „ + 2 „ 0	2 „ + 3 „ 0	1/2 „ + 1 „ 0	1 „ 0	1 „ 0	2 „ + 3 „ 0	2 „ + 3 „ 0
	4 „	9 „ + 12 „ 0	1 „ + 2 „ 0	1 „ + 2 „ 0	1/2 „ 0	1 „ 0	1 „ 0	4 1/2 „ + 5 1/2 „ 0	1 „ + 2 „ 0

Bei einer Vergleichung der Tabelle II mit I tritt die im Verhältnis zu den Aussaaten stark erhöhte Widerstandsfähigkeit der Organismen in der Kultur dem Lysoform gegenüber in die Erscheinung. Am auffallendsten ist dies bei Staph. aureus, der in der Kultur der Einwirkung einer 4-proz. Lysoformlösung 540mal so lange Widerstand leistet als in der Aussaat.

Das Lysoform dringt mithin nur sehr langsam in dickere Bakterienmassen ein. Es hat nur eine geringe Tiefenwirkung.

Besonders auffallend war bei diesen Versuchen das Verhalten des Diphtheriebacillus und des Streptococcus. Diese Organismen zeigten, nachdem sie mit dem Lysoform behandelt waren, bei ihrer Ueberimpfung in Peptonbouillon eine außerordentlich geringe Resistenz; dagegen erwiesen sie sich bei der Uebertragung auf Serum den anderen Organismen gleichwertig, d. h. sie wuchsen in einer Bouillon, in welcher die Kontrollen kräftig sich entwickelten, nicht mehr, während gleiche Proben, auf Serum ausgesät, kräftig gediehen. So gaben z. B. Aussaaten von Diphtheriekulturen, welche 1 Stunde mit einer 1-proz. Lösung behandelt waren, in Bouillon keine Entwickelung mehr, während auf Serum selbst nach 12-stündiger Behandlung mit einer 1-proz. Lösung noch Wachstum erfolgte. Dieser auffallende Unterschied dürfte, da eine entwickelungshemmende Wirkung der mit übertragenen Lysoformmengen nicht in Frage kam, so zu erklären sein, daß der Diphtheriebacillus und der Streptococcus durch das eine gewisse Zeit einwirkende Desinficiens zwar nicht abgetötet, aber doch so geschwächt waren, daß sie sich in dem für sie nicht so günstigen Nährboden, der Bouillon, nicht mehr zu vermehren vermochten, wohl aber in dem ihnen ganz adäquaten Serum.

Bei der Durchsicht der Tabelle zeigen sich einige Unregelmäßigkeiten in der Abtötungszeit zwischen der 3- und 4-proz. Lösung. Es ist der Staph. aureus noch bei einer 9-stündigen Behandlungsdauer mit einer 4-proz. Lösung gewachsen, während eine andere Kultur durch die Einwirkung einer 3-proz. Lösung in derselben Zeit abgetötet ist. Aehnlich verhält es sich bei dem Diphtheriebacillus. Der Grund dafür ist höchstwahrscheinlich in äußeren Zufälligkeiten, so besonders in einer etwas verschiedenen Dicke der Kulturschicht zu suchen.

Aus den Versuchen mit den Aussaaten wie mit den Kulturen ergiebt sich in übereinstimmender Weise, daß am widerstandsfähigsten der Staph. aureus war. Dann kommen Diphtheriebacillen, Bact. coli und Typhusbacillus, die etwa die gleiche Resistenz zeigen, dann der Streptococcus und als letzten in der Reihe finden wir den Choleraerreger.

Vergleichen wir das Abtötungsvermögen der verschiedenprozentigen Lösungen den Kulturen gegenüber, so sehen wir, daß die 2-proz. Lösung etwa doppelt so stark wirkt wie die 1-proz. und die 4-proz. etwa doppelt so stark wie die 2-proz., während die baktericide Kraft der 3-proz. etwa in der Mitte zwischen der 2- und 4-proz. steht.

Zur Prüfung der Wirksamkeit des Lysoforms auf Kulturen in flüssigem Nährboden verfuhr ich folgendermaßen: 9 ccm Bouillon wurden mit je einer Oese aus dem Kondenswasser einer Agar- resp. Serumkultur (Diphtheriebacillus und Streptococcus) besät und 48 Stunden der Brüttemperatur ausgesetzt, dann wurde zu den kräftig entwickelten Kulturen, nachdem die Kulturmasse in den Röhrchen durch Schütteln möglichst gleichmäßig verteilt war, je 1 ccm einer 10-, 20-, 30-, 40-proz. Lysoformlösung hinzugesetzt, so daß jedes Röhrchen 1 resp. 2-, 3-, 4 Proz.

Lysoform enthielt. Durch das kräftige Schütteln ist eine ganz gleichmäßige Verteilung der Keime in der Bouillon nicht immer zu erzielen gewesen bei dem Diphtheriebacillus und dem Streptococcus. Die Bouillonkultur enthielt vielfach noch kleine Konglomerate dieser Bakterien, welche dem Desinficiens einen größeren Widerstand boten als die einzelnen Bakterien.

Nach bestimmten Zeiten wurde dann je eine Oese der mit Lysoform versetzen Kultur in frische Bouillonröhrchen übertragen und diese in den Brütschrank gestellt. Von den Diphtherie- und Streptococcus-Kulturen wurden gleichzeitig auch Aussaaten auf Serum angelegt. Die Beobachtungszeit währte auch hier acht Tage.

In Tabelle III sind die auf diese Weise ermittelten Werte zusammengestellt.

Tabelle III.

Desinficienz	Stärke der Lösung	Bouillonkulturen Ueberimpfungen in Bouillonröhrchen.						Bouillonkulturen. Ueberimpfungen auf Serum.	
		Staph. aureus	Typhusbacillus	Bacterium coli	Cholera-vibrio	Dipht. Bacillus	Streptococcus	Dipht. Bac.	Streptococcus
	1 Proz.	$5^3/_4$ St. +	$5^3/_4$ St. +	$4^1/_2$ St. +	2 St. +	10′ +	5′ +		
		12 „ 0	12 „ 0	$5^3/_4$ „ 0	3 „ 0	15′ 0	13′ 0		
	2 Proz.	$5^3/_4$ „ +	3 „ +	3 „ +	$^1/_2$ „ +	1′ +	1′ 0		
		12 „ 0	4 „ 0	$4^1/_2$ „ 0	1 „ 0	5′ 0			
	3 Proz.	4 „ +	1 „ +	1 „ +	10′ +	5′ +	1′ 0	1 St. +	30′ +
		$5^3/_4$ „ 0	2 „ 0	2 „ 0	20′ 0	10′ 0		2 „ 0	$1^1/_2$ St. 0
	4 Proz.	2 „ +	$^1/_2$ „ +	$^1/_2$ „ +	10′ +	1′ 0	2′ 0	15′ +	18′ +
		3 „ 0	1 „ 0	1 „ 0	20′ 0			45′ 0	45′ 0

Diese Tabelle ergiebt, daß durch Lysoform Bouillonkulturen weit schneller abgetötet werden, als Kulturen auf festen Nährböden.

Auch bei diesem Versuche zeigte sich, daß die aus den mit Lysoform behandelten Diphtherie- und Streptococcus-Kulturen entnommenen Keime bei der Uebertragung auf Serum noch imstande waren, sich zu vermehren, während die aus denselben Kulturen nach gleich langer oder kürzerer Zeit in Bouillon überimpften Keimen sich nicht mehr entwickelten. Jedoch ist hier der Unterschied ein geringerer als bei dem vorigen Versuche.

Da von Beginn der Versuche an eine stark entwickelungshemmende Wirkung des Lysoforms in die Erscheinung trat, war es von Wichtigkeit, die Konzentration zu ermitteln, welche imstande war, das Wachstum der einzelnen Organismen zu verhindern. Zu diesem Zwecke setzte ich zu je 9 ccm Bouillon resp. flüssigen Blutserums je 1 ccm sterilisierten Wassers hinzu, welches die bestimmte Menge Lysoform enthielt. Dann erfolgte die Aussaat je einer Oese aus dem Kondenswasser je einer 24-stündigen Agar- resp. Serumkultur (bei Diphtherie und Streptococcus) und je eines Milzbrandsporenfadens. Durch den Zusatz der Lysoformlösung zur Bouillon entstand eine so stark schillernde Trübung, daß in der trüben Flüssigkeit eine Vermehrung der Mikroorganismen, ausgenommen sind die Milzbrandsporen, nicht ohne weiteres erkannt werden konnte. Es mußte die Untersuchung im hängenden Tropfen

zu Hilfe genommen werden. Außerdem verfuhr ich noch folgendermaßen: Nachdem die Keime in der Bouillon, resp. dem Serum möglichst gleichmäßig verteilt waren, wurde zunächst den Kontrollröhrchen unmittelbar nach dem Besäen 1 Oese entnommen, dieselbe in Gelatine verteilt und damit Platten gegossen. Nachdem sämtliche Röhrchen 24 Stunden im Brütapparate gestanden hatten, wurden in der gleichen Weise sowohl von den Kontrollen, als auch von den anderen Röhrchen Platten hergestellt. Die Anzahl der Keime ergab dann Aufschluß über die Entwickelungshemmung nach 24 Stunden. Nach 8-tägigem Aufenthalte der Röhrchen im Brütapparat wurden Aussaaten auf Agar gemacht. Es ergab sich dann, ob in der Bouillon Entwickelung stattgefunden hatte, bezw. ob noch entwicklungsfähige Keime darin waren.

Die Milzbrandsporenfäden, welche in der Bouillon während der Beobachtungszeit von 8 Tagen nicht gewachsen waren, übertrug ich in frische Bouillon.

Beim Serum war die schillernde Trübung, die das Lysoform erzeugte, so beschaffen, daß das Wachstum sofort zu erkennen war. Jedoch wurde auch hier die Vermehrung durch Agaraussaaten kontrolliert.

Die nachfolgenden Tabellen IV und V enthalten die gefundenen Grenzwerte. Bei der Beurteilung der obigen Zahlen muß man jedoch folgendes in Erwägung ziehen. Man könnte annehmen, daß die Zahlen, welche die Menge des zur Entwickelungshinderung nötigen Lysoforms angeben, zu niedrig sein könnten, weil durch das Verdunsten des Formaldehyds möglicherweise allmählich eine weniger konzentrierte Lösung entstanden sein könnte, die dann eine Weiterentwickelung aller der Keime gestattet haben würde, welche bis dahin nicht abgetötet waren. Diese Annahme trifft jedoch nicht zu.

Tabelle IV.
Entwickelungshinderung in Bouillon.

Organismen	Stärke d. Lösung	Resultat
Milzbrandsporen	1:2000 1:1500	+ 0
Staph. aureus	1:1000 1: 800	+ 0
Typhusbacillus	1:2000 1:1000	+ 0
Bacterium coli	1:2000 1:1000	+ 0

Tabelle V.
Entwickelungshinderung in Serum.

Organismen	Stärke d. Lösung	Resultat
Milzbrandsporen	1:1000 1: 800	+ 0
Staph. aureus	1: 800 1: 500	+ 0
Typhusbacillus	1:1000 1: 800	+ 0
Bacterium coli	1: 800 1: 500	+ 0
Diphtheriebacillus	1: 800 1: 500	+ 0
Choleravibrio	1:5000 1:2000	+ 0

Bei den nicht sporenbildenden Organismen hat sich gezeigt, daß aus den Lösungen, in welchen eine Entwickelung nach 8 Tagen nicht eintrat, später überhaupt nichts mehr gewachsen ist. Es war mithin, wenn nach 8 Tagen Beobachtung nichts gewachsen war, die Entwickelungsbehinderung gleichbedeutend mit Abtötung.

Bei den Milzbrandsporen verhielt sich die Sache anders.

Während in den Lösungen bis 1:1500 kein Wachstum mehr auftrat

bei 8-tägiger Beobachtungszeit, zeigten bei Aussaat in Bouillon alle nach 8 Tagen aus den verschiedenen Konzentrationen herausgenommenen Fäden mit Ausnahme desjenigen, welcher in einer Konzentration von 1:100 gelegen hatte, kräftiges Wachstum.

Von den Fäden, welche aus den mit Lysoform versetzten Serumröhrchen herausgenommen und in Bouillon ausgesät wurden, zeigten die aus den Konzentrationen 1:500—1:800 kein Wachstum mehr; diese Fäden hatten aber 22 Tage in dem Serumdesinficiens gelegen. Es sind mithin diese ganz schwachen Lösungen imstande gewesen, bei 3-wöchentlicher Einwirkung die Milzbrandsporen abzutöten.

Ein Vergleich der beiden Tabellen lehrt, daß das Desinficiens in der Peptonbouillon besser wirkt als in dem eiweißreichen Serum. Bemerkenswert ist ferner, daß das Auskeimen der Milzbrandsporen schon durch geringere Lysoformmengen verhindert wurde, als z. B. das Wachstum des Staph. aureus in Bouillon und das des Bact. coli und Diphtheriebacillus im Serum. Am empfindlichsten zeigte sich auch hier wieder der Choleravibrio, welcher im Serum bei einer Konzentration von 1:2000 sich nicht mehr fortpflanzen konnte.

Da das Lysoform für die Desinfektion von Bürsten empfohlen wird, schien es von Interesse, einige diesbezügliche Versuche anzustellen.

Bei der Bürstendesinfektion verfuhr ich folgendermaßen:

Nicht gebrauchte Handbürsten, wie sie in der Greifswalder Klinik verwendet werden, wurden im Dampftopf sterilisiert und dann in eine Aufschwemmung einer 24-stündigen Agarkultur von Staph. aureus resp. Bact. coli gelegt. Nach 24-stündigen Verweilen in der Flüssigkeit ließ ich die Bürsten 2—3 Tage an einem dunkelen Orte etwas trocknen. Dann brachte ich sie, nachdem Kontrollen angelegt waren, in eine 5-proz. Lysoformlösung. Nach bestimmten Zeiten, nach $5^1/_4$, 6 und 7 Stunden schnitt ich eine Anzahl Borsten möglichst dicht am Holze ab. Die Borsten säte ich bei einem Versuch, nach Abspülen in Bouillon, in flüssiges Agar aus, das später zu Platten verarbeitet wurde, während sie bei dem zweiten Versuch in Bouillon belassen wurden. Die Aussaaten wurden 8 Tage beobachtet. Nach 6-stündigem Einwirken hatte die 5-proz. Lösung alle Keime vernichtet. Nur eine Agarplatte, die mit 7 Stunden hindurch desinfizierten Bakterium coli Borsten beschickt war, zeigte zahlreiche Kolonieen. Zur Desinfektion der Bürsten wäre daher bei Anwendung einer 5-proz. Lösung eine Einwirkungsdauer von mindestens 6—7 Stunden erforderlich.

Nachdem ich nun meine Versuche mitgeteilt habe, gebe ich in der folgenden Tabelle noch eine übersichtliche Zusammenstellung derselben. Ferner enthält diese Tabelle noch die Resultate über die desinfizierende Wirkung des Lysoforms, nach Pfuhl und Symanski, des Formalins und der Karbolsäure. Diese Werte sind mit eingefügt, teils um die Möglichkeit zu geben, meine Resultate mit anderen vergleichen zu können, teils weil es von Interesse war, nachzusehen, ob das Lysoform dem Formalin, sowie der Karbolsäure gleichwertig wäre.

Wenden wir uns zunächst den Resultaten Pfuhl's zu. Er prüfte die keimtötende Kraft des Lysoforms, indem er an Seidenfäden angetrocknete Kulturen der Einwirkung des Desinfiziens aussetzte. Eine 1-proz. Lysoformlösung tötete beim ersten Versuch den Staph. aureus in 12 Stunden nicht ab, während bei einem 2. Versuch es derselben Lösung in 6 Stunden gelang. Der 2-proz. erlag der Staph. aureus in 12 Stunden, der 3-proz. in 6 Stunden.

Tabelle VI.

Desinficiens	Stärke der Lösung	Staphylococcus aureus					Typhusbacillus					Choleravibrio			
		Wirkungszeit auf			Menge des zur Entwickelungshemmung nötigen Lysoforms		Wirkungszeit auf			Menge des zur Entwickelungshemmung nötigen Lysoforms		Wirkungszeit auf			Menge des zur Entwickelungshemmung nötigen Lysoforms in Serum
		Aussaaten	Kulturen auf festen Nährböden	Kulturen auf flüssigen Nährböden	a in Bouill.	b in Serum	Aussaaten	Kulturen auf festen Nährböden	Kulturen auf flüssigen Nährböden	in Bouillon	in Serum	Aussaaten	Kulturen auf festen Nährböden	Kulturen auf flüssigen Nährböden	
	%														
	1	26′	24 St.	12 St.			26′	12 St.	12 St.			5′	4 St.	3 St.	
	2	10′	25 1/2 „	12 „			3′	4 „	4 „			1′	2 „	1 „	
	3	3′	9 „	5 3/4 „			45″	2 „	2 „			1′	1 „	20′	
	4	45″	12 „	3 „			45″	2 „	1 „			30″	1/2 „	20′	
					1 : 800	1 : 500				1 : 1000	1 : 800				1 : 2000
Dr. Symanski. Lysof.	3														
A. Pfuhl Lysoform, Kultur an Seidenfäden	1			12 St. +					6 „						
	1			6 „					3 „						
	2			12 „					3 „						
	3			6 „					3 „	1 : 100					
Karbolsäure eigener Versuch	2	25′	50′ +				10′	50′ +							
	4	5′	10′				2′	4′							
					1 : 400					1 : 500					
Karbolsäure Kuprianow	1	4′													
	2	3′	45′		4 ccm 1 : 350		3′	30′		0,5 ccm 1 : 1050		2′	15′		0,4 ccm 1 : 1300
Formalin Walter	0,1			2 St. +					1 3/4 St.					1 St.	
	1			45′					20′					5′	
					1 : 10 000 (in Gelatine)					1 : 10 000 (in Gelatine)					1 : 10 000 (in Gelatine)

Desinficiens	Stärke der Lösung	Bacterium coli					Diphtheriebacillus							Streptococcus pyogenes							Milzbrandsporenfäden		
		Wirkungszeit auf			Menge des zur Entwickelungshemmung nötigen Lysoforms			Wirkungszeit auf Kulturen				Menge des zur Entwickelungshemmung nötigen Lysoforms			Wirkungszeit auf Kulturen				Menge des zur Entwickelungshemmung nötigen Lysoforms		Wirkungszeit auf Sporenfäden	Menge des zur Entwickelungshemmung nötigen Lysoforms	
			Kulturen					auf festen Nährboden übertragen		auf flüssig. Nährboden übertragen					auf festen Nährboden übertragen		auf flüssig. Nährboden übertragen						
	%	Aussaaten	auf festen Nährböden	auf flüssigen Nährböden	in Bouill.	in Serum	Aussaaten	in Bouill.	auf Serum	in Bouill.	auf Serum	in Serum		Aussaaten	in Bouill.	auf Serum	in Bouill.	auf Serum	in Serum			in Bouill.	in Serum
	1	35′	12 St.	$5^3/_4$ St.			25′	1 St. 0	$25^1/_2$ St.	15′				10′	1 St. 0	$6^1/_2$ St.	13′				8 St.		
	2	3′	$4^1/_2$ „	$4^1/_2$ „			5′	1 „ 0	$6^1/_2$ „	5′				3′	1 „ 0	$4^1/_2$ „	1′						
	3	2′	3 „	2 „			2′	1 „ 0	3 „	10′	2 St.			2′	1 „ 0	3 „	1′	$1^1/_2$ St.			6 „		
	4	1′	2 „	1 „			1′	1 „ 0	$5^1/_2$ „	1′	45′			1′	1 „ 0	2 „	2′	45′					
					1:1000	1:500						1:500									5% 4 St.	1:1500	1:800
Dr. Symanski. Lysof.	3																				8 St.		
A. Pfuhl Lysoform, Kultur an Seidenfäden	1																				12 „ +		
	1																				12 „ +		
	2																				12 „ +		
	3																				12 „		
Karbolsäure eigener Versuch	2																						
	4																						
Karbolsäure Kuprianow	1																						
	2																						
Formalin Walter	0,1									$1^1/_4$ St.							20′						
	1									15′							1′						
													1:10000 (in Gelat.)										1:10 000 (in Gelat.)

Die Zahlen geben die Einwirkungsdauer des Lysoforms an, nach der Wachstum nicht mehr eingetreten ist.

Tabelle VI.

Desinficiens	Stärke der Lösung	Staphylococcus aureus					Typhusbacillus					Choleravibrio			
		Wirkungszeit auf			Menge des zur Entwickelungshemmung nötigen Lysoforms		Wirkungszeit auf			Menge des zur Entwickelungshemmung nötigen Lysoforms		Wirkungszeit auf			Menge des zur Entwickelungshemmung nötigen Lysoforms in Serum
		Aussaaten	Kulturen auf festen Nährböden	Kulturen auf flüssigen Nährböden	a in Bouill.	b in Serum	Aussaaten	Kulturen auf festen Nährböden	Kulturen auf flüssigen Nährböden	in Bouillon	in Serum	Aussaaten	Kulturen auf festen Nährböden	Kulturen auf flüssigen Nährböden	
	%														
	1	26′	24 St.	12 St.			26′	12 St.	12 St.			5′	4 St.	3 St.	
	2	10′	25½ „	12 „			3′	4 „	4 „			1′	2 „	1 „	
	3	3′	9 „	5¾ „			45″	2 „	2 „			1′	1 „	20′	
	4	45″	12 „	3 „			45″	2 „	1 „			30″	½ „	20′	
					1 : 800	1 : 500				1 : 1000	1 : 800				1 : 2000
Dr. Symanski. Lysof.	3														
A. Pfuhl Lysoform, Kultur an Seidenfäden	1			12 St. +					6 „						
	1			6 „					3 „						
	2			12 „					3 „						
	3			6 „					3 „	1 : 100					
Karbolsäure eigener Versuch	2	25′	50′ +				10′	50′ +							
	4	5′	10′				2′	4′							
					1 : 400					1 : 500					
Karbolsäure Kuprianow	1	4′													
	2	3′	45′		4 ccm 1 : 350		3′	30′		0,5 ccm 1 : 1050		2′	15′		0,4 ccm 1 : 1300
Formalin Walter	0,1			2 St. +					1¾ St.					1 St.	
	1			45′					20′					5′	
					1 : 10 000 (in Gelatine)					1 : 10 000 (in Gelatine)					1 : 10 000 (in Gelatine)

Desinficiens	Stärke der Lösung	Bacterium coli					Diphtheriebacillus							Streptococcus pyogenes							Milzbrandsporenfäden		
			Wirkungszeit auf Kulturen		Menge des zur Entwickelungshemmung nötigen Lysoforms			Wirkungszeit auf Kulturen				Menge des zur Entwickelungshemmung nötigen Lysoforms			Wirkungszeit auf Kulturen				Menge des zur Entwickelungshemmung nötigen Lysoforms		Wirkungszeit auf Sporenfäden	Menge des zur Entwickelungshemmung nötigen Lysoforms	
								auf festen Nährboden übertragen		auf flüssig. Nährboden übertragen					auf festen Nährboden übertragen		auf flüssig. Nährboden übertragen						
	%	Aussaaten	auf festen Nährböden	auf flüssigen Nährböden	in Bouill.	in Serum	Aussaaten	in Bouill.	auf Serum	in Bouill.	auf Serum	in Serum		Aussaaten	in Bouill.	auf Serum	in Bouill.	auf Serum	in Serum			in Bouill.	in Serum
	1	35′	12 St.	5¾ St.			25′	1 St. 0	25½ St.	15′				10′	1 St. 0	6½ St.	13′				8 St.		
	2	3′	4½ „	4½ „			5′	1 „ 0	6½ „	5′				3′	1 „ 0	4½ „	1′						
	3	2′	3 „	2 „			2′	1 „ 0	3 „	10′	2 St.			2′	1 „ 0	3 „	1′	1½ St.			6 „		
	4	1′	2 „	1 „			1′	1 „ 0	5½ „	1′	45′			1′	1 „ 0	2 „	2′	45′					
					1:1000	1:500						1:500									5% 4 St.	1:1500	1:800
Dr. Symanski. Lysof.	3																				8 St.		
A. Pfuhl Lysoform, Kultur an Seidenfäden	1																				12 „ +		
	1																				12 „ +		
	2																				12 „ +		
	3																				12 „		
Karbolsäure eigener Versuch	2																						
	4																						
Karbolsäure Kuprianow	1																						
	2																						
Formalin Walter	0,1									1¼ St.							20′						
	1									15′							1′						
													1:10000 (in Gelat.)										1:10 000 (in Gelat.)

Die Zahlen geben die Einwirkungsdauer des Lysoforms an, nach der Wachstum nicht mehr eingetreten ist.

Diese Werte Pfuhl's für den Staph. aureus entsprachen etwa den von mir für die Wirksamkeit des Lysoforms auf Bouillonkulturen des Staph. aureus ermittelten Werten. Dagegen wirken die 1—3-proz. Lösungen nach Pfuhl auf dem Typhusbacillus besser, als ich es gefunden habe.

Auffallend ist das Resultat, das Pfuhl über die entwickelungshemmende Kraft des Lysoforms dem Typhusbacillus gegenüber fand. Während man nach den Kulturversuchen erwarten sollte, das Lysoform werde den Typhusbacillus in einer niedrigeren Konzentration als der von mir gefundenen 1:1000 in der Entwickelung hindern, ist erst eine Lösung von 1:100 bei Pfuhl dazu imstande.

Dieser Unterschied hat meiner Meinung nach seinen Grund darin, daß Pfuhl am 3. Tage aus den mit dem Desinficiens versetzten Röhrchen in frische Bouillon übergeimpft hat. Es ist nun wahrscheinlich, daß am 3. Tage auch in den Röhrchen, in denen keine Vermehrung des eingesäten Materials eingetreten ist, sich noch lebende Keime befinden, die dann natürlich beim Uebertragen in Bouillon weiter wachsen. Auf diese Weise findet man mithin nicht die Entwickelungshinderung, sondern die Abtötung. Um die Entwickelungshinderung zu beweisen, hätte er Plattenkulturen anlegen müssen.

Zur Vergleichung mit dem Formalin habe ich die Arbeit von Walter benutzt.

Walter fand, daß ein Formalinzusatz von 1:10000 zur Gelatine imstande sei, den Staph. aureus, den Typhusbacillus, den Diphtheriebacillus, den Choleravibrio und den Milzbrandbacillus in seiner Entwickelung zu behindern. Die Beobachtungszeit währte 8 Tage.

Einen Unterschied in der Beeinflussung der einzelnen Organismen hatte er nicht gefunden.

Eine Formalinlösung von 1:10000 entspricht etwa einer Lysoformlösung von 1:1800—1:2000.

Die von mir für das Lysoform ermittelten Werte sind für die einzelnen Bakterienarten etwas voneinander verschieden. Sie schwanken zwischen 1:500—1:2000, sind mithin zum Teil gleich, zum Teil etwas niedriger als die Werte, welche man, auf Formalin berechnet, nach den Angaben Walter's erwarten sollte.

Den Choleravibrio hemmt das Lysoform in einer Konzentration von 1:2000 in seiner Entwickelung. Am nächsten kommt dann der Wert für die Entwickelungshemmung der Milzbrandsporen in Bouillon, die in einer Konzentration von 1:1500 nicht mehr auszukeimen vermochten.

Am weitesten weicht von der Zahl Walter's das Resultat für den Staphylococcus aureus ab, der im Serum erst bei einer Konzentration von 1:500 keinen für seine Vermehrung geeigneten Nährboden mehr fand. Berücksichtigt man hier die Verschiedenheit der Prüfungsmethode, so muß man, da die Zahlen zum Teil nur etwas geringer sind, dem Lysoform etwa annähernd die gleichen entwickelungshemmenden Eigenschaften zusprechen, wie einer entsprechenden Formalinlösung. Eine Erhöhung der entwickelungshemmenden Kraft des Formalins ist durch die Umwandelung in das Lysoform nicht herbeigeführt worden.

Ein etwas anderes Resultat ergiebt ein Vergleich des Abtötungsvermögens gegenüber Kulturen. Angeordnet waren die Formalinversuche folgendermaßen.

Walter stellte in sterilisierten Erlenmeyer-Kolben Formalinlösungen von bestimmter Konzentration her. In diese wurden Auf-

schwemmungen einer 24-stündigen Agarkultur gegossen und tüchtig umgeschüttelt. Nach bestimmten Zeiten erfolgte tropfenweise Aussaat in verflüssigte Gelatine, die zu Platten gegossen wurde. Leider kann ich nicht ganz gleichprozentige Lösungen vergleichen. Die von Walter verwandte 0,1-proz. Formalinlösung entspricht etwa einer 0,5-proz., die 1-proz. einer 5-proz. Lysoformlösung.

Es hatte eine 0,1-proz. Formalinlösung den Staph. aureus in 2 Stunden nicht,

den Typhusbacillus dagegen in $1^3/_4$ Stunden
„ Diphtheriebacillus „ 1 Stunde
„ Choleravibrio „ 1 „
„ Strept. pyog. „ 20 Minuten

abgetötet.

In meinen Versuchen (Tabelle III) vernichtete eine 1-proz. Lysoformlösung, die doppelt so kräftig hätte wirken sollen wie die Waltersche 0,1proz. Formalinlösung,

den Staph. aureus erst bei 12-stündiger Einwirkung
„ Typhusbacillus „ „ 12- „ „
„ Choleravibrio „ 3- „ „
„ Diphtheriebacillus „ 15 Min. langer „
„ Strept. pyogenes „ 1 Stde. „ „

Die 1-proz. Formalinlösung tötet

den Staph. aureus in 45 Minuten
„ Typhusbacillus „ 20 „
„ Choleravibrio „ 5 „
„ Diphtheriebacillus „ 15 „
„ Strept. pyog. „ 1 Minute

Dagegen vernichtet die 4-proz. Lysoformlösung

den Staph. aureus in 3 Stunden
„ Typhusbacillus „ 1 Stunde
„ Choleravibrio „ 20 Minuten
„ Diphtheriebacillus „ 45 „
„ Strept. pyog. „ 45 „

Eine 5-proz. Lysoformlösung, welche ich bei meinen Versuchen nicht verwendet habe, würde natürlich besser gewirkt haben wie die 4-proz. Eine bessere Wirkung als die 1-proz. Formalinlösung würde sie vermutlich jedoch nicht gezeigt haben.

Zum Schlusse will ich die keimtötende Wirkung des Lysoforms noch mit der der Karbolsäure vergleichen.

Nach einem vergleichenden Versuche, der in der Schlußtabelle mitgeteilt ist, wirkt Lysoform stärker baktericid auf Aussaaten von Typhusbacillus und Staph. aureus als Karbolsäure, auch hindert es die Entwickelung dieser Organismen in einer niedrigeren Konzentration wie diese.

Den Kulturen gegenüber steht jedoch das Lysoform der Karbolsäure weit nach, denn eine 4-proz. Karbolsäurelösung hat den Staph. aureus in 10 Minuten abgetötet, während derselbe bei der gleichen Versuchsanordnung dem Lysoform über 9 Stunden Widerstand geleistet hat.

Diese Versuchsreihe entspricht in der Ausführung genau der meiner anderen Versuche. Hergestellt sind die Karbolsäurelösungen mit Acidum carbolicum liquefactum.

Was die in der Schlußtabelle mitgeteilten, von Kuprianow über die Karbolsäure ermittelten Werte anlangt, so würde nach dem Resultate der Aussaaten die 2-proz. Karbolsäure etwa einer 2-proz. Lysoformlösung entsprechen.

Die baktericide Kraft der Karbolsäure den Kulturen gegenüber scheint auch in diesem Versuche außerordentlich viel höher zu sein als die des Lysoforms, so daß z. B. beim Typhusbacillus die 2-proz. Karbolsäurelösung besser als die 4-proz. Lysoformlösung wirkt und die 2-proz. Lysoformlösung um das 8-fache übertrifft.

Bei dem Choleravibrio ist die baktericide Kraft der 2-proz. Karbolsäurelösung 4mal so groß als die der gleichen Lysoformlösung. Noch mehr differieren die Werte für den Staph. aureus. Was dagegen die Entwickelungshinderung anlangt, so wirkt auch hier das Lysoform besser als die Karbolsäure. Der Staph. aureus wird z. B. von dem Lysoform bei 1 : 800 an der Entwickelung gehindert, während die Karbolsäure dies erst bei 1 : 350 thut.

In der Schlußtabelle habe ich noch von Herrn Dr. Gehrke, Assistenten des hygienischen Institutes, ermittelte Werte über die Zeit, in welcher Milzbrandsporen durch Lysoform abgetötet werden, mitgeteilt.

Die 1-proz. Lösung vernichtet Milzbrandsporen in 8 Stunden
„ 3- „ „ „ „ „ 6 „
„ 5- „ „ „ „ „ 4 „

Das Lysoform zeigt mithin dieselbe auffallende elektive Wirkung gegenüber dem Milzbranderreger, wie sie von Hammer und Feitler für das Formalin dargethan ist.

Zum Schlusse möchte ich das Urteil über das Lysoform als Desinficiens dahin zusammenfassen, daß dasselbe unzweifelhaft imstande ist, die von mir geprüften Organismen sowohl in Aussaat wie in Kultur abzutöten, daß es jedoch gegenüber den Kulturen einer relativ langen Einwirkungsdauer im Vergleich mit anderen Desinficientien dazu bedarf.

Seine entwickelungshemmende Kraft ist eine recht bedeutende; sie übertrifft die der Karbolsäure und kommt der des Formalins etwa gleich.

Es ist mir eine angenehme Pflicht, Herrn Geh. Medizinalrat Prof. Dr. Loeffler, sowie Herrn Dr. Gehrke, Assistenten des hygienischen Institutes, für die überaus liebenswürdige Unterstützung bei der vorliegenden Arbeit meinen herzlichsten Dank zu sagen.

Litteratur.

Pfuhl, A., Ueber Lysoform und Albargin. (Hygien. Rundschau. Jahrg. XII. No. 3.)
Symanski, Einige Desinfektionsversuche mit einem neuen Desinficiens Lysoform. (Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. Bd. XXXVII. Heft 3.)
Walter, Zur Bedeutung des Formalins bezw. Formaldehyds als Desinfektionsmittel. (Zeitschr. f. Hyg. Bd. XXI. p. 421—451.)
Kuprianow, Ueber die desinfizierende Wirkung des Guajakols. (Centralbl. f. Bakt. etc. Abt. I. Bd. XV. p. 933, 981.)

Die kombinierte Wirkung chemischer Desinfektionsmittel und heisser Wasserdämpfe.

(Aus dem hygienischen Institute der Universität Göttingen.]

Von Stabsarzt **Keisaku Kokubo** aus Japan.

Wir können die zur Zeit gebräuchlichen Desinfektionsmittel in zwei große Gruppen einteilen, einmal solche, die thermisch, d. h. lediglich durch Temperaturerhöhung, wirken, wie Verbrennen, trockene Hitz oder

heiße Wasserdämpfe, und zweitens chemisch wirkende, wie die Säuren, Alkalien, Kresole, ätherischen Oele und viele andere, deren Aufzählung hier zu weit führen würde. Es lag nahe, die Wirkung beider Gruppen von Mitteln zu kombinieren, um dadurch einmal die Intensität der Infektion zu steigern, auf der anderen Seite die nötige Desinfektionsdauer womöglich abzukürzen. Thatsächlich ist dieses denn auch schon seit lange versucht und für viele Zwecke der Praxis als vorteilhaft erprobt worden. So weiß man längst, daß Soda- und Seifenlösungen durch Erwärmen auf 50—60° ganz bedeutend wirksamer werden als bei gewöhnlicher Zimmertemperatur, und von einer großen Reihe von Mitteln ist ähnliches bekannt. Auch auf die Untersuchungen von v. Brunn[1]) und Frank[2]) möchte ich hinweisen; dieselben konnten zeigen, daß heiße Alkoholdämpfe in ganz anderer Weise desinfizieren, als dieses gewöhnlicher flüssiger Alkohol thut. So weit mir bekannt, ist es jedoch bisher noch nicht versucht worden, ob man nicht durch Zusatz von chemisch wirkenden Desinfektionsmitteln zu kochendem Wasser die Dämpfe dieses Wassers wirksamer desinfizierend machen kann, selbst wenn diese Zusätze nicht in größerer Menge, wie z. B. Alkohol es natürlich thut, in den Dampf erfahrungsgemäß übergehen, weil sie einen Siedepunkt haben, der oft weit über der Siedetemperatur des einfachen Wasserdampfes liegt. Daß nichtsdestoweniger öfter, wenn auch nur Spuren dieser schwerer siedenden Chemikalien von dem einfach strömenden Wasserdampf mitgerissen werden, ist leicht zu bemerken, wenn es sich um riechende Mittel handelt, die sich dann auch im Wasserdampf durch ihren Geruch verraten, wie es z. B. viele ätherische Oele thun. So war es denn wohl der Mühe wert, einmal den oben erwähnten Versuch zu unternehmen, und ich habe daher auf den Rat von Prof. v. Esmarch eine ganze Reihe von Mitteln, wie ich gleich vorausschicken will, mit sehr verschiedenem Erfolge probiert.

Die Versuchsanordnung war eine relativ einfache. Als Verdampfungsapparat benutzte ich entweder einen ganz kleinen Koch'schen Dampfkochtopf mit enger oberer Dampfabströmungsöffnung, in welche zugleich schnell und ohne viel Dampfverlust die Testobjekte hineingebracht resp. wieder entfernt werden konnten, oder ich wandte einen kleinen Apparat an, den schon v. Brunn bei seinen Alkoholversuchen im hiesigen Institute benutzt hatte, und wie er ihn in seiner Arbeit[3]) genau und mit Abbildung beschrieben hat, so daß ich wohl von einer weiteren Erläuterung des Apparates hier absehen kann. Ich will nur bemerken, daß es sich sehr bequem mit ihm arbeiten läßt und daß namentlich das Ein- und Ausbringen der Testobjekte sich äußerst schnell und ohne viel Temperatur- und Dampfeinbuße ermöglichen läßt. Die Dämpfe wurden, wie bei v. Brunn, meistens wieder in einem an den Apparat angeschlossenen Kühler kondensiert, schon um die oft scharf riechenden Substanzen aus den Dämpfen nicht in das Zimmer gelangen zu lassen. Als Testobjekte konnten selbstverständlich nur solche mit widerstandsfähigen Sporen genommen werden, da sporenlose ja ohne weiteres durch einfach strömenden Wasserdampf in wenigen Sekunden zu Grunde gehen, eine Steigerung der Wirksamkeit von 100-gradigem Dampfe durch Zusatz von Chemikalien in diesem Falle auch nicht nachzuweisen gewesen wäre. Ich wählte 3 verschiedene Sporenbildner von möglichst ver-

---

1) Centralbl. f. Bakt. etc. Abt. I. Bd. XXVIII. 1900. p. 309 ff.
2) Münch. med. Wochenschr. 1901. No. 4.
3) l. c.

schiedener Resistenz, um dadurch zugleich zu prüfen, ob eine etwa vorhandene Steigerung der Desinfektionswirkung alle Sporen gleichmäßig kräftig beeinflussen würde oder nicht.

Das erste Testobjekt war ein gewöhnlicher Kartoffelbacillus, der nach $^1/_2$-stündigem Kochen einer Kartoffel noch auf derselben lebend geblieben war; er wächst sehr üppig unter Bildung einer faltigen Haut auf der Kartoffel und bildet in 22° C innerhalb 72 Stunden sehr zahlreiche und gut ausgebildete Sporen. Der zweite Bacillus wurde gewonnen, indem ich Heuinfus 15 Minuten kochte und sodann davon auf Agar Abstriche machte. Es wuchs ein Bacillus, der nach 72 Stunden in 22° C sehr schöne, teils freie, teils noch in den Bacillen liegende Sporen bildete. Da letztere meist an einem Ende den Bacillus stark auftrieben, habe ich ihn einfach als trommelschlägelförmigen bezeichnet. Als dritten sporenbildenden Bacillus habe ich Milzbrand benutzt, und zwar die gewöhnliche Institutskultur des Göttinger Institutes, welche sehr reichlich Sporen einer mittleren Resistenz bildet. Das erste, womit ich begann, war natürlich, festzustellen, wie groß die Resistenz der Sporen, welche ich in gewöhnlicher Weise an Seidenfäden 24 Stunden im Exsiccator antrocknen ließ, im einfach strömenden Dampfe war. Die Tabelle I giebt darüber Auskunft.

Ich habe diese Probe im einfach strömenden Dampfe noch mehrfach im Laufe der Versuche wiederholt, um mich zu überzeugen, ob die Widerstandsfähigkeit der Sporen eine gleiche geblieben war oder nicht. Bei dem Milzbrand und dem Trommelschlägelbacillus war das bis zum Ende der Versuche der Fall, der Kartoffelbacillus oder vielmehr seine Sporen nahmen dagegen später an Resistenz ab und hielten nunmehr nur 80 Minuten lang strömenden Dampf aus, während er früher 130 Minuten Dampf widerstanden hatte. Es sind dementsprechend auch die Zahlen für Chinosol und Formaldehyd, soweit sie den Kartoffelbacillus betreffen, auf diese verminderte Resistenz desselben zu beziehen, was nicht außer acht gelassen werden darf. Außer diesen Kontrollen sind auch noch diejenigen Versuche gleichsam als Kontrolle zu benutzen, in denen anscheinend nichts mit von dem zugesetzten Mittel im Dampfe überging, und die daher genau so desinfizierten, als wenn nur gewöhnliches Wasser verkocht worden wäre (siehe Sublimat, Schwefelsäure, Resorcin). Endlich will ich noch bemerken, daß ich, um eine Durchnässung der in den Dampf gebrachten Sporenseidenfäden durch gröbere kondensierte Tropfen möglichst zu verhindern, diese Fäden nicht in das Drahtnetz des Apparates hineingelegt habe, sondern daß ich die einzelnen Fäden in kleine Spalten eines Holzkeiles festklemmte, so daß die Fäden frei in die Luft hinausragten. Der so mit ca. 6—10 Fäden armierte Holzkeil wurde dann seinerseits mit dem Verschlußkork der Einführungsöffnung des Apparates fest verbunden, so daß auf diese Weise die Fäden auf das schnellste in den Apparat eingeführt und wieder aus demselben entfernt werden konnten. Nach der Herausnahme aus dem Apparate wurden die einzelnen Seidenfäden an der Einklemmstelle mit einer sterilen Scheere abgeschnitten und in Bouillon eingebracht, worin sie bei Brüttemperatur stets mehrere Tage blieben und auf etwa noch sich einstellende Entwickelung täglich untersucht wurden.

Alle Versuche sind immer doppelt ausgeführt worden, d. h. es wurden jedesmal 2 Fäden verwendet, die getrennt nach der Einwirkung des Dampfes in je ein Bouillonröhrchen gebracht wurden. Es war dadurch möglich, eine etwas größere Genauigkeit in der Grenzbestimmung der jedesmaligen Abtötung zu erhalten. Da ich bezüglich der Wirksam-

keit der verschiedenen Zusätze zunächst gar nicht orientiert war, mußte ich natürlich jedesmal eine sehr große Reihe von Versuchen mit jedem Mittel ausführen und bin regelmäßig so verfahren, daß ich in den ersten 10 Minuten jede Minute, sodann in Abständen von 5 Minuten, endlich in solchen von 10 Minuten immer Probefäden aus dem Apparat entnahm. Dabei wurden die Versuche mit dem Kartoffelbacillus stets auf eine Gesamtdauer von 3 Stunden, die mit dem Trommelschlägelbacillus bis 10 Minuten, mit den Milzbrandsporen ebenso lange fortgesetzt.

Die auf ihre Desinfektionswirkung zu prüfenden Substanzen wurden dem Wasser in 1, 2 und 3 Proz. zugesetzt und nur bei dem Formalin und Kreosot, da sich dieselben selbst in 1-proz. Lösung noch als so ungemein kräftig desinfizierend erwiesen, noch weiter bis 0,1 resp. 0,5 Proz. mit der Verdünnung heruntergegangen. Ebenso ist auch Sublimat in 0,1 Proz. verwendet worden. Zum Verständnis der nachstehend angeführten Tabellen sei bemerkt, daß, wo 2 Zahlen in einer Abteilung stehen, sich die eine auf den ersten, die andere auf den zweiten Seidenfaden bezieht, so daß, wenn beispielsweise bei der 1-proz. Essigsäure und beim Milzbrand 1—2 steht, dieses bedeutet, daß in der zweiten Versuchsreihe nach 1 Minute einer der Fäden noch lebte und erst bei 2 Minuten Einwirkung abgetötet war. Der besseren Uebersichtlichkeit wegen habe ich die probierten Mittel in einzelne Gruppen zusammengefaßt, und zwar je nach ihrer chemischen Zusammengehörigkeit, soweit solches überhaupt möglich war. Die erste Tabelle zeigt die Widerstandsfähigkeit der 3 Bakteriensporen in einfach strömendem Dampfe.

Tabelle I (Wasserdampf).

Kartoffelbacillus	Trommelschlägelbacillus	Milzbranzbacillus
130 Minuten	7—8 Minuten	4 Minuten

Tabelle II (Sublimat 1:1000).

Kartoffelbacillus	Trommelschlägelbacillus	Milzbrandbacillus
130 Minuten	7 Minuten	4 Minuten

Wie aus dem Vergleiche mit Tabelle I ersichtlich, ist kein Unterschied zwischen Tabelle I und II bemerkbar, d. h. es darf wohl angenommen werden, daß Sublimat nicht mit im Dampfe übergegangen ist, da sonst doch zweifellos bei der starken desinfizierenden Kraft eine Wirkung sich bemerkbar gemacht haben würde. Sublimat hat einen Siedepunkt von etwa 300°, doch wird angegeben, daß bei Kochen wässeriger Lösungen sich etwas Quecksilberchlorid mit den Wasserdämpfen verflüchtigt. Nach meinen Versuchen kann das jedoch bei so stark verdünnten Lösungen nicht der Fall sein.

Tabelle III.

Desinfektionsmittel	Konzentration %	Temperatur des Dampfes in °	Kartoffelbacillus Minuten	Trommelschlägelbacillus Minuten	Milzbrandbacillus Minuten
Essigsäure	1	100	40	3	2
"	2	99,5	25	2—3	1
"	3	99,0	20—25	2	1
Schwefelsäure	1	100	130	7	4
"	2	100	130	7	4
"	3	100	130	7	4

Die dritte Tabelle behandelt die beiden untersuchten Säuren, und zwar eine anorganische und eine organische. Während die Schwefelsäure ebenso wie Sublimat durchaus keine Wirkung gegenüber einfachem Wasserdampf zeigt, ist dieselbe bei der Essigsäure sehr deutlich zu erkennen. Schon in 1-proz. Verdünnung desinfiziert sie alle 3 Sporenarten 3—4mal so stark wie Wasserdampf ohne Essigsäure und bei Anwendung 2- und 3-proz. Lösungen ist die Wirkung noch weiter erhöht. Frank hat l. c. konzentrierte und 75-proz. Essigsäure verdampft und dabei ebenfalls eine gewisse desinfizierende Wirkung beobachtet, die jedoch an die meiner Versuche lange nicht heranreicht. Er teilt nicht mit, bei welcher Temperatur er seine Essigsäure verdampft hat, und ich darf wohl annehmen, daß er viel niedrigere Temperaturen wie ich angewendet hat.

Tabelle IV.

Desinfektionsmittel	Konzentration %	Temperatur des Dampfes in °	Kartoffelbacillus Minuten	Trommelschlägelbacillus Minuten	Milzbrandbacillus Minuten
Karbolsäure	1	100	60	4	3
"	2	100	40	3	3
"	3	100	9	3	3
Trikresol	1	98,0	50—60	3	2
"	2	98,5	40	3	2
"	3	98,0	30	2	1—2
Kreolin	1	100	110	7	2
"	2	99,0	100	6—7	1—2
"	3	99,2	50	3	1—2
Kreosot	kaltgesätt.	98,8	30	2—3	1—2
"	0,5	99,0	25	1—2	1
"	1	98,8	20	1—2	1
"	2	98,7	8	1	1
"	3	98,5	6	1	1
Resorcin	1	99,0	130	7	4
"	2	99,0	120—130	5	2—3
"	3	99,0	120—130	4—5	2—3

Es folgen Versuche mit Kresolen und verwandten Körpern. Karbolsäure sowohl wie Trikresol haben bemerkenswerte Einwirkung, während Kreolin und Resorcin in schwächeren Lösungen dem einfachen Wasserdampfe kaum, deutlich erst in 2—3-proz. Konzentration überlegen sind. Kreosot hat dagegen wieder eine ganz überraschend starke Desinfektionskraft, die sogar diejenige der Essigsäuredämpfe um ein erhebliches übertrifft (s. Tabelle V. p. 239).

Von den ätherischen Oelen, die ja bekanntlich teilweise recht starke Desinfektionsmittel sind und sich ja auch zumeist leicht verflüchtigen, habe ich 5 untersucht und füge gleich hier noch das Thymol hinzu, da ich es sonst nicht gut unterbringen kann.

Alle diese Oele zeigen, besonders als 2- und 3-proz. Mischungen mit Wasser verdampft, deutlich gesteigerte Desinfektionseffekte, die Unterschiede zwischen den einzelnen Mitteln scheinen aber nicht bedeutend zu sein. Das Thymol verhält sich ganz ähnlich (s. Tab. VI. p. 239).

In der Tabelle VI fällt zunächst auf, daß das Chloroform Wasserdampfgemisch nicht kräftiger desinfiziert. Bei dem niedrigen Siedepunkte desselben hätte man vielleicht zusammen mit dem Dampfe wirkend doch einen Effekt erwarten können, der größer als der that-

Tabelle V.

Desinfektionsmittel	Konzentration %	Temperatur des Dampfes in °	Kartoffelbacillus Minuten	Trommelschlägelbacillus Minuten	Milzbrandbacillus Minuten
Terpentinöl	1	100	120	6	2
"	2	100	110	6	2
"	3	100	90	4	2
Eukalyptusöl	1	100	120	5—6	2
"	2	100	110	5	1—2
"	3	100	80	4	1—2
Oleum pini pumilionis	1	98,7	110	3—4	2—3
" " "	2	99,0	90	2	1—2
" " "	3	98,0	60	2	1—2
Anisöl	1	98,5	110—120	3	1—2
"	2	99,0	110	2—3	1—2
"	3	99,0	90	2—3	1
Cedernholzöl	1	99,0	110	3—4	1
"	2	98,0	90	2	1
"	3	98,5	70	2	1
Thymol	0,5	100	120	4—5	1—2

Tabelle VI.

Desinfektionsmittel	Konzentration %	Temperatur des Dampfes in °	Kartoffelbacillus Minuten	Trommelschlägelbacillus Minuten	Milzbrandbacillus Minuten
Chloroform	1	98,0	130	3	3
"	2	99,0	130	2	3
"	3	98,0	130	2	2
Aceton	1	98,5	130	3	2
"	2	98,5	120	2	1
"	3	98,5	110	2	1
Benzaldehyd	1	99,0	70—80	6	2
"	2	98,8	40	5—6	1—2
"	3	98,8	20	2—3	1
Formaldehyd	0,1	98,6	7	2—3	1
"	0,5	98,4	3	1	1
"	1	98,5	2—3	1	1
"	2	98,2	2	1	1
"	3	98,2	2	1	1

sächlich zu erzielende war. Es wird sich das wohl so erklären lassen, daß Chloroformdampf eben an und für sich auch in höherer Konzentration kein besonderes Desinfektionsmittel ist. Aceton steht dem Chloroform in seiner Wirkung etwa gleich. Von den beiden untersuchten Aldehyden ist der Formaldehyd dem Benzaldehyd, obgleich auch der letztere schon in 1-proz. Lösung recht kräftig desinfiziert, bei weitem überlegen.

Es wird das nicht überraschen, da die kräftige Wirkung des Formaldehydwasserdampfgemisches ja schon länger bekannt und in ausgedehntem Maße in der Praxis benutzt wird. Freilich, die ungemein schnelle und selbst in den dünnsten Lösungen sich zeigende Zunahme der Desinfektionskraft mit Erhöhung der Temperatur des Wasserdampfes auf 100° war von mir nicht erwartet worden. Es wird sich dieselbe vielleicht noch für die Praxis vorteilhaft verwerten lassen; es

sprechen dafür wenigstens Versuche, welche zur Zeit im Institute angestellt werden und demnächst veröffentlicht werden sollen.

Tabelle VII.

Desinfektionsmittel	Konzentration %	Temperatur des Dampfes in °	Kartoffelbacillus Minuten	Trommelschlägelbacillus Minuten	Milzbrandbacillus Minuten
Chinosol	1	98,8	60—70	3	1
"	2	98,9	50	3	1
"	3	98,3	20	3	1
Nitrobenzol	1	98,2	50—60	2	2
"	2	98,4	30	2	1—2
"	3	98,3	20	1—2	1—2

Als letzte Mittel, die, weil sonst nirgends recht unterzubringen, in eine gemeinsame kleine Tabelle zusammengefaßt worden sind, wurden untersucht das Chinosol und Nitrobenzol. Beide zeigen recht erhebliche Desinfektionswirkung, die sie in dieser Beziehung etwa dem Trikresol gleichwertig erscheinen lassen.

Damit ist die Reihe meiner Versuche erschöpft; sie macht natürlich auf Vollständigkeit keinen Anspruch. Es kam mir im wesentlichen darauf an, einmal festzustellen, ob überhaupt durch Zusatz von Chemikalien zum einfach kochenden Wasser den Dämpfen eine Steigerung der desinfizierenden Wirkung verliehen werden kann. Als dieses durch die ersten Versuche im bejahenden Sinne entschieden war, habe ich aus jeder Gruppe der als flüssige Desinfektionsmittel bekannten Chemikalien einzelne herausgegriffen. Es konnte sodann nachgewiesen werden, daß diese Zusätze von sehr verschiedener Wirkung waren, und es ist sogar sehr wahrscheinlich, daß unter den nicht untersuchten Mitteln eine ganze Reihe sich finden wird, die den untersuchten an Wirkung gleichstehen, ja sie vielleicht nicht unerheblich übertreffen werden. Es wäre wohl der Mühe wert, der Sache noch weiter auf den Grund zu gehen, zumal, da sich, wie ich schon oben anführte, möglicherweise wichtige Folgerungen für die Praxis daraus ergeben können.

Zum Schlusse ist es mir eine angenehme Pflicht, meinem hochverehrten Lehrer, Herrn Prof. v. Esmarch, für die freundliche Anregung zu dieser Arbeit und die liebenswürdige Unterstützung bei der Ausführung derselben, für letztere auch Herrn Dr. Reichenbach, meinen verbindlichsten Dank auszusprechen.

Inhalt.

Originalmitteilungen.

Frommannsche Buchdruckerei (Hermann Pohle) in Jena.

CENTRALBLATT

für

Bakteriologie, Parasitenkunde und Infektionskrankheiten

Erste Abteilung:

Mediz.-hygien. Bakteriologie u. tier. Parasitenkunde

Originale

In Verbindung mit

Geh. Med.-Rat Prof. Dr. Loeffler, Greifswald, **Prof. Dr. R. Pfeiffer, Prof. Dr. M. Braun** Königsberg i. Pr.

herausgegeben von

Dr. O. Uhlworm in Berlin W., Schaperstr. 2/3 I

Verlag von Gustav Fischer in Jena

XXXII. Band. —○— **Jena,** den 25. August 1902. —○— **No. 4.**

Preis für den Band (50 Bogen) 15 Mark. Schwierige Tafeln werden einem Bogen gleich gerechnet. — Die Nummern erscheinen zwanglos je nach dem vorliegenden Stoffe. Bei Einzelverkauf Preis für einen einfachen Druckbogen 40 Pfg., für eine Tafel 60 Pfg.

Hierzu als regelmäſsige Beilage die Inhaltsübersichten der II. Abteilung des Centralblattes.

Die Redaktion des „Centralblatts für Bakteriologie und Parasitenkunde" richtet an die Herren Mitarbeiter die ergebene Bitte, etwaige Wünsche um Lieferung von besonderen Abdrücken ihrer Aufsätze entweder bei der Einsendung der Abhandlungen an die Redaktion auf das Manuskript schreiben zu wollen oder spätestens nach Empfang der ersten Korrekturabzüge direkt an den Verleger, Herrn Gustav Fischer in Jena, gelangen zu lassen.

Original-Mitteilungen.

Die wichtigsten Methoden der Bakterienfärbung in ihrer Wirkung auf die Membran, den Protoplasten und die Einschlüsse der Bakterienzelle.

[Arbeit aus dem Botanischen Institute der Universität Marburg.]

Von **Arnold Grimme,**

Kreistierarzt in Melsungen (Hessen-Nassau).

Mit 2 Tafeln.

(Fortsetzung.)

Wasser. In kaltem Wasser werden die Kugeln nach 2—3 Tagen gelöst. Es tritt weder mit Methylenblau noch mit Karbolfuchsin eine Reaktion ein. Ein Behandeln mit 50—60° heißem Wasser beeinträchtigt die Methylenblaureaktion der Kugeln nicht. Nach einem Erhitzen mit

Wasser auf 70° C tritt diese Reaktion nicht mehr ein, wohl aber lassen sich die Kugeln noch mit Karbolfuchsin färben. Die dunkelroten Kugeln verschwinden nicht in 5-proz. Natriumkarbonat; sie blassen aber allmählich in Wasser ab. Dieselbe Reaktion tritt noch ein, wenn die Präparate 5 Minuten lang in 75° heißem Wasser gehalten wurden. Nach einer Behandlung mit 80° heißem Wasser während 5 Minuten treten nur noch einzelne Kugeln in der Karbolfuchsinfärbung hervor; in anderen Präparaten ist auch dies nicht mehr der Fall. 80° heißes Wasser löst auch die mit Methylenblau gefärbten Kugeln völlig. Die Blaufärbung der Kugeln mit Methylenblau tritt aber noch ein, wenn man die Präparate trocken oder mit der Methylenblaulösung beträufelt, auf 70—80° erhitzt. Es ist nicht möglich, die Volutanskugeln durch Formol, absoluten Alkohol, Osmiumsäure 1-proz., durch die Flamme ziehen so zu fixieren, daß sie, mit heißem Wasser behandelt (80° — 5 Minuten), sich noch in Methylenblaulösung färben. Auch die Karbolfuchsinfärbung bringt nach Anwendung oben genannter Fixierungsmittel (Einwirkung während 1 bis 2 Stunden) die roten Kugeln nicht zur Darstellung mit einer Ausnahme: Präparate von Spirillum volutans (3 Tage alt), die 2 Stunden in Alkohol absolutissimus aufbewahrt und dann 5 Minuten lang in Wasser auf 80—85° C erhitzt wurden, zeigten nach Behandlung mit heißem Karbolfuchsin noch eine Menge von roten Kugeln (etwa $^1/_3$—$^1/_2$ der ursprünglichen Zahl). Eine Gegenfärbung mit Methylenblau färbte das Plasma blau, während die Kugeln ihre rote Farbe behielten. An Stelle der herausgelösten Kugeln fanden sich kleinere, runde weiße Lücken (Fig. XII *r*).

Verdauungsversuche. Von einer 3 Tage alten Spirillum volutans-Kultur entnahm ich mittels Platinöse reichliche Mengen des Belages und vermischte dieses Material in einem kleinen Reagenzröhrchen mit einer frischen Trypsinlösung (siehe p. 33) der einige Tropfen Toluol zugesetzt waren. Zum Vergleich setzte ich ein zweites Röhrchen in derselben Weise an, nachdem ich jedoch vorher dem Ferment durch Kochen seine Wirksamkeit genommen hatte. Nach 3-tägigem Aufbewahren bei 40° C konnte ich in dem ausgeschleuderten Spirillenmaterial beider Röhrchen noch reichliche Mengen von Volutanskugeln durch Methylenblau nachweisen, die aber kleiner waren als nach 24-stündiger Einwirkung, was Wasserwirkung allein schon bewirkt haben könnte. Pepsinverdauungsversuche waren nicht zu verwerten, da schon die verdünnte Salzsäure die Kugeln nach kurzer Zeit löst.

Einfluß des Nährbodens. Durch die von mir verwendeten Nährböden wurde das Auftreten der Volutanskugeln scheinbar nicht beeinflußt (Agar und Gelatine mit und ohne Dextrose). Spirillum volutans wurde nur auf Zettnow'schen Spirillenagar gezüchtet.

II. Allgemeine Uebersicht über das Verhalten der Volutanskugeln.

1. Ihre Löslichkeit in den verschiedenen Reagentien.

Bezüglich des Ausdrucks Lösung und Entfärbung siehe p. 41.

In destilliertem Wasser lösen sich die Kugeln bei einer Brutschranktemperatur von 28° nach etwa 2 Tagen. In heißem Wasser beginnen sich die Kugeln bei 80° nach einigen Minuten zu lösen. In kochendem Wasser lösen sie sich sofort oder nach kurzer Zeit.

In schwachen Säuren (1-proz.) werden die Kugeln erst nach längerer Einwirkung (bis 24 Stunden) gelöst; in 5-proz. Lösungen schon nach einigen Minuten. Noch stärkere Säuren zerstören sie sofort.

In Alkalien (Kalilauge und Natriumkarbonat) lösen sich die Kugeln ebenfalls schnell, und zwar nach 5 Minuten in jeder Konzentration.

Konz. Jodjodkalium löst die Kugeln langsam.

In Kochsalzlösung, selbst 10-proz., lösen sich die Kugeln nach $^1/_4$-stündiger Einwirkung noch nicht. Gleichfalls werden die Kugeln nicht gelöst in Alkohol, Aether, Chloroform, Chloralhydrat, Chlorzinkjod, Karbolwasser, Eau de Javelle und Jodjodkaliumlösung *sch*.

2. Ihre Färbbarkeit.

Eine direkte Färbung der Volutanskugeln mit einfachen Farbstoffen wird erreicht in Methylenblau, Methylviolett, Fuchsin, Karbolfuchsin, Bismarckbraun, Safranin. Langsam erfolgt die Färbung in Hämatoxylin.

Andere Arten der Färbung werden erzielt durch Vereinigung zweier aufeinander folgender Färbungen mit verschiedenen Farbstoffen oder von einem Farbstoff und einem Reagens, z. B. Methylenblau + Bismarckbraun, Methylenblau + Jodjodkalium; Karbolfuchsin + 5-proz. Schwefelsäure (vorübergehende Färbung).

Die Alkalien zerstören die Methylenblaufärbung sofort bei allen Kugeln und in jeder Konzentration. Es tritt nach dieser Entfärbung trotz sorgfältiger Ausspülung in Wasser eine zweite Färbung in Methylenblaulösung nicht mehr ein, dagegen färbt Karbolfuchsin die Kugeln eventuell wieder, wenn das Alkali nur sehr kurz eingewirkt hat. In den Alkalien bleiben die anderen Färbungen (Karbolfuchsin, Methylviolett, Bismarckbraun) sowie die Mischfarben von Methylenblau + Bismarckbraun und + Jod in demselben Farbenton bestehen. Die schwachen Säuren, sowie Alkohol entfärben alle Kugelfärbungen langsam; es besteht jedoch den Alkalien gegenüber der besondere Unterschied dieser Entfärbungen darin, daß bei diesen innerhalb der oben erwähnten Löslichkeitsgrenzen sich stets eine Wiederfärbung mit Methylenblau hervorrufen läßt. Gleiche Entfärbungen der mit Methylenblau gefärbten Kugeln treten nach Einwirkung von Eau de Javelle, Chloralhydrat, Chlorzinkjod, Karbolwasser ein.

3. Ihr Verhalten gegen Fixierungsmittel.

Formaldehyd fixiert die Volutanskugeln derart, daß sie trotz Aufkochen der Methylenblaufarblösung, nach welcher Behandlung sie sonst nicht darstellbar sind, als blaue Kugeln hervortreten. Sie lösen sich jetzt langsamer in Natriumkarbonat; in heißem Wasser (80°) aber nach 5 Minuten.

Osmiumsäure, 1-proz., fixiert ebenfalls die Kugeln. Die nun hervorgerufene Methylenblaufärbung erweist sich gegen einstündige Einwirkung von 1-proz. Kalilauge als widerstandsfähig. In kochender Methylenblaulösung treten aber die mit Osmiumsäure behandelten Kugeln nicht hervor. Desgleichen lösen sie sich in heißem Wasser.

Absoluter Alkohol fixiert nach 2-stündiger Einwirkung jedoch die Kugeln soweit, daß ein großer Teil von ihnen sich nach 5 Minuten langer Einwirkung von 80° heißem Wasser noch nicht gelöst hat (sie färben sich nicht mehr mit Methylenblau, wohl aber noch mit heißem Karbolfuchsin).

4. Ihr Verhalten gegen besondere Reagentien.

In Jodjodkaliumlösung färben sich die Kugeln nur in der Farbe des Reagens, sind in Jodjodkaliumlösung *sch* noch stärker lichtbrechend, in

der konzentrierteren schwächer lichtbrechend als das umgebende Cytoplasma, was, wie gesagt, wohl wesentlich auf der gleichzeitig eintretenden Veränderung des Cytoplasmas beruht. In Eau de Javelle verändern sich die Volutanskugeln nicht, auch nicht in Chloralhydrat. Durch Einwirkung von Millon's Reagens werden sie sofort gelöst.

5. Ihr Verhalten gegen Trypsin und Pepsin.

Die Verdauungsfermente wirken auf die Volutanskugeln nicht anders als Wasser allein.

Von besonderem Interesse war für meine Untersuchungen die Beobachtung Krompecher's (1901), der bei einem sporenbildenden Bacillus, B. alvei, das Vorhandensein von Babes-Ernst'schen Körperchen auffand, deren Uebereinstimmung mit den Volutanskugeln von vornherein wahrscheinlich erschien und sich nach einer genauen Untersuchung der Reaktionen dieser Körner auch als richtig erwies. Bei Untersuchung dieses Bacillus fand ich, daß die Kugeln in fast allen Entwickelungsstadien desselben sich finden. In den Keimstäben sind sie nicht häufig, aber doch schon in solchen zu beobachten, die erst 2-stäbig sind und denen die Sporenmembran noch anhaftet (Fig. XV *a*). Die Volutanskugeln sind auch hier noch klein. In den Stadien, die etwa 18 Stunden alt sind, erreichen sie in ihrer Methylenblaufärbung schon die beiderseitigen Zellwände, bauchen sie auch zuweilen aus. Meist liegen die Kugeln in diesen Formen an den Zellpolen, oft sogar regelmäßig, und stellen meiner Ansicht nach diejenigen Gebilde dar, welche von vielen Beobachtern gesehen und als Sporen bezeichnet wurden. Buchner hält jene als Polkugeln oder Polkörner bezeichneten Körper, die er beim Typhusbacillus genauer untersuchte, für Plasmaballen, die an den Polen zusammengedrängt wurden (Fig. XI *b*). In den Stadien, welche der Sporenbildung sich nähern, sind die Kugeln erheblich dicker geworden und liegen dann oft nur an einem Pole der Zelle. Beim Beginn der Sporangienanschwellung liegt sehr oft eine Kugel im Bereiche derselben und nach dem Auftreten der Sporenvakuole am Rande der Vakuole (Fig. XV c^{6-9} c^{11} c^{12} c^{13}, XVI *c*, XVII *c*—*g*). Nach völliger Ausbildung der Spore sieht man nur noch selten eine Kugel im Sporangium. Man kann jedoch regelmäßig dann eine die Spore umgebende, rotblaue Zone konstatieren, die an der Sporenseite scharf, an der Plasmaseite aber unscharf begrenzt ist. In jüngeren Sporenstadien fehlt diese Hülle stets. Auch die frei gewordenen Sporen sind meist noch von einer dunkelblauroten Hülle umgeben. Bei B. asterosporus und B. fusiformis verhalten sich die Volutanskugeln ebenso.

Einmal fand ich in einer 12 Tage alten Kultur, welche nicht von abgekochtem Material stammte, kräftige Keimstäbchen, denen ebenfalls die Sporenmembran noch anhing und die auch Volutanskugeln, und zwar sehr dicke, zeigten (Fig. XV *b*). Ich halte diese für solche, die entweder bei Entwickelung der Kolonie zurückgeblieben sind und sich nicht weiter entwickelt haben oder aus auf demselben Nährboden gebildeten Sporen wieder ausgekeimt sind.

Aus der Beobachtung der Volutanskugeln im Materiale einer nicht sporenbildenden Pseudomonas-Species, welches verschiedenen auf Agar + Dextrose bei 28° gehaltenen Kulturen entnommen wurde, ergab sich, daß in 5 Stunden alten Kulturen die Kugeln nach der Färbung mit Methylenblau nur als kleinste, punktförmige Gebilde zu sehen sind, die wegen der Kleinheit und wegen der Ueberdeckung durch die Plasmafarbe

meist nur nach Differenzierung mit Jodjodkalium oder Bismarckbraun in ihrer Gesamtheit erkannt werden können. In 24 Stunden alten Kulturen haben sie meist schon eine die seitlichen Zellgrenzen erreichende Dicke erlangt. In 30—36 Stunden altem Material sind die Kugeln schon recht zahlreich und gleichgroß. Neben den Volutanskugeln machen sich jetzt schon viele andere, stark lichtbrechende Kugeln, die sich mit Sudan III und Gelblösung färben, in denselben Zellen bemerkbar (Fetttropfen). In 3—4 Tage alten Pseudomonas-Kulturen sind die Einschlüsse beider Art in reichlicher Menge und ansehnlicher Größe in fast allen Zellen (Kurzzellen und Fäden) nachzuweisen. Vom 8.—10. oder 12. Tage an werden die Volutanskugeln seltener und ebenfalls die Fettkugeln. In manchen Kulturen sieht man die ersteren nur noch vereinzelt im Gesichtsfelde der Präparate. Auch in Kulturen, die mehrere Wochen alt waren, kann man noch vereinzelte jener Kugeln nachweisen. Oft führte in solchen Fällen nur noch ein Zusatz von Jodjodkaliumlösung *sch* oder Bismarckbraun zum Ziele, da der scharfe Kontrast zwischen den nun schwarz beziehungsweise blauschwarz gefärbten Kugeln zum gelben Cytoplasma das Auffinden der wenigen Kugeln bedeutend erleichterte.

In auf Spirillenagar bei 28° angelegten Kulturen von Spirillum volutans verhielten sich die Volutanskugeln wie folgt. In 10 Stunden alten Kulturen sind sie, mit Methylenblau gefärbt, noch sehr klein, während die auch hier vorhandenen Fetttropfen schon recht groß sind (Fig. XII *d*). Nach 24 Stunden sind sie größer, nach 48 Stunden größere und kleinere nebeneinander und sehr zahlreich. Nach 3 und 4 Tagen erreichen sie zum Teil eine ungeheure Größe (Fig. XII *e*). Vom 5. Tage ab werden sie vereinzelter und sind in älteren Kulturen nur noch in einzelnen Zellen, welche oft fädige Gestalt annehmen und auch Verzweigungen bilden, zu beobachten. Näheres hierüber wird Herr Ellis, der zur Zeit die Morphologie von Spirillum volutans bearbeitet, bringen.

Auch die Diphtheriebakterien (ich benutzte zu meinen Versuchen eine mir von Herrn Geheimrat v. Behring freundlichst überlassene Kultur einer stark virulenten Rasse, welche bezeichnet war Db—H II), enthalten echte Volutanskugeln, also solche, welche alle die von mir beschriebenen Reaktionen zeigen.

Die Kulturen, welche auf Pferdeblutserum angelegt waren, untersuchte ich zunächst etwa 16 Stunden nach der Impfung. Die Mehrzahl der Diphtheriebakterien hatte die Gestalt eines längeren Stäbchens; vereinzelt fanden sich degenerierende Formen, mit keuligen Enden oder Verzweigungen (Fig. XVIII *a*—*e*). Nach der Methylenblaufärbung traten in reichlicher Menge kleinere und größere rotblaue Kugeln auf, von denen einzelne schon im ungefärbten Präparate als lichtbrechende Körner im Innern der Bakterienzelle sichtbar gewesen waren.

Eine weitere Eigentümlichkeit der Diphtheriebakterien ist das Auftreten von heller gefärbten oder ungefärbten Lücken im Innern des Zellleibes. Nicht selten sind diese hellen Flecke in Gestalt von Querbändern angeordnet und verleihen dem Diphtheriebakterium die eigenartige Segmentierung, welche schon lange als ein charakteristisches Merkmal desselben und seiner Verwandten gilt. Auf Grund meiner Beobachtungen konnte ich feststellen, daß jene hellen Flecke und Segmente durch Zellsaftvakuolen bedingt werden. Als solche charakterisieren sie sich dadurch, daß sie Farbstoffe nicht annehmen und bei hoher Einstellung dunkel, bei tiefer hell erscheinen; außerdem zeigen sie keine Gelbfärbung in Jodjodkaliumlösung, wohl aber treten sie in diesem Reagenz schärfer

begrenzt hervor. Am 3.—4. Tage nach der Impfung hat sich das mikroskopische Bild der Diphtheriebakterien sehr verändert. Nach voraufgegangener stärkerer Fadenbildung tritt jetzt an diesen Fäden eine Abschnürung von kurzen, dicken Stäbchen ein (Fig. XVIII *h* und *i*). Während die Fäden durch unregelmäßige Begrenzung und schwächere Farbstoffaufnahme, sowie auch durch Verschwinden der vorher zahlreichen Volutanskugeln ein krankhaftes Aussehen bekommen, zum Teil auch wohl schon abgestorben sind, kennzeichnen sich die abgeschnürten Kurzstäbchen als lebenskräftige Morphoden mit reichlich Protoplasma und vielen Volutanskugeln (Fig. XVIII *k*—*o*). Besonders interessant ist die Erscheinung, daß jene Zellabschnürung sich auf kleine Bezirke der Kolonie beschränkt. Man sieht zur Zeit der lebhaften Bildung von Kurzzellen auf der Oberfläche der bisher gleichmäßig glatten Kolonie kleine, etwa hirsekorngroße, glasige Körnchen sich erheben. Nimmt man das Untersuchungsmaterial von diesen Körnchen, so bekommt man fast nur die lebendigen Kurzstäbchen zu Gesicht; entnimmt man dagegen das Material der dazwischen liegenden älteren Koloniefläche, so zeigt das Präparat nur Fäden, die sehr häufig Verzweigungen besitzen, aber schon alle die Kennzeichen des Absterbens, wie Fehlen der Volutanskugeln, schlechtes Färbungsvermögen und unregelmäßige Begrenzung, an sich tragen.

Während der ersten 16 Stunden nach der Impfung waren die untersuchten Kulturen bei 34°, von da ab bei 28° gehalten worden.

III. Vergleich der Volutanskugeln mit Kohlehydraten, Fett und Eiweiss.

Mit den bis jetzt bei Bakterien gefundenen Kohlehydraten (A. Meyer 1899) haben die Reaktionen der Volutanskugeln keine Uebereinstimmung gezeigt; die Volutanskugeln färben sich mit Jod (in schwacher oder starker Lösung) nicht anders als das Cytoplasma, während jene Kohlehydrate mit Jod entweder blau oder braunrot (Glykogen) gefärbt werden. Mit dem Reservestoff Fett haben die Volutanskugeln insofern eine Aehnlichkeit, als sie auch in Gestalt von lichtbrechenden, scharf begrenzten Kugeln im ungefärbten Präparate sich zeigen. Durch die Farbstoffreaktionen lassen sich beide Einschlüsse jedoch bei sorgfältiger Beobachtung leicht voneinander unterscheiden. Die Fettkugeln färben sich in Sudan- und Gelblösung, die Volutanskugeln nicht; letztere färben sich stark unter Quellung mit den Anilinfarben, die Fetttropfen färben sich damit nicht. Dennoch scheinen früher manchmal Fetttropfen mit Volutanskugeln im ungefärbten Zustande verwechselt worden zu sein.

Die Volutanskugeln haben einige Eigenschaften, welche es nicht unwahrscheinlich machen, daß sie zu den Eiweißkörpern im weitesten Sinne gehören. Zuerst ist in dieser Hinsicht zu erwähnen, daß sich die Kugeln durch Formaldehyd, Osmiumsäure oder Alkohol bis zu einem gewissen Grade schwerlöslich machen lassen. Zweitens ist zu erwähnen, daß sie in kaustischen und kohlensauren Alkalien, starken Säuren leicht löslich sind, drittens schwer löslich in verdünnten Säuren und unlöslich in Alkohol, Aether und Chloroform. Zu beachten ist, daß die Stoffe in Pepsinsalzsäure und Trypsin nicht wesentlich angegriffen werden und die gewöhnlichen Eiweißreaktionen: Die Millon'sche Reaktion, die Xanthoproteïnreaktion, die Reaktion mit Ferrocyankalium und Eisenchlorid nicht geben.

Sicher ist es, daß die Kugeln Reservestoffe der Bakterien darstellen.

Es geht dies hauptsächlich daraus hervor, daß die Menge dieses Körpers bis zur Fertigstellung der Sporangien von den Keimstäbchen ab zunimmt, mit dem Fortschreiten der Sporenbildung abnimmt und derselbe nach Fertigstellung der Spore meist verschwunden ist. Es verhält sich dieser Stoff also genau so, wie es A. Meyer (1899) für Fett und Glykogen gezeigt hat.

Welche protoplasmatischen und alloplastischen Organe und welche ergastischen Gebilde treten bei den verschiedenen Färbemethoden hervor, und wie ist deren Verhalten gegen die verschiedenen Reagentien?

A. Oidien.

I. Protoplasmatische Organe.

a) Zellkern. Die von Arthur Meyer (1897 u. 1899) als Zellkerne der Bakterien angesprochenen Gebilde des Protoplasten, welche sich mittels der Formolfuchsinmethode sichtbar machen lassen (also diejenigen Gebilde, welche in der jungen Sporenvakuole auftreten und die diesen gleichwertigen Gebilde des übrigen Protoplasten), habe ich in mehreren Fällen ebenfalls beobachtet und zwar bei B. tumescens (S. 5) sowohl wie bei B. asterosporus. Häufig sind die Kerne in den Keimstäben zu sehen, da sie in diesen durch keine anderen Zelleinschlüsse verdeckt werden. Besonders gut sind sie in jungen Sporangien zu beobachten, in denen sie durch ihre Beteiligung an der Sporenbildung fast regelmäßig im Centrum der Sporenvakuole liegen. Sie sind kleine rundliche, in Formolfuchsin hellrot gefärbte Körnchen, die in der Regel keine besonders scharfe Begrenzung aufweisen, aber sich von dem blaßrosa gefärbten Vakuoleninhalt scharf abheben. Sie treten in der Ein- oder Mehrzahl in einer Zelle auf. Bei Anwendung der Methylenblausudanmethode habe ich mit Sicherheit keine Körnchen nachweisen können, welche den in Formolfuchsin sichtbar gewordenen zweifellos entsprochen hätten; auch nicht in der einfachen Methylenblaufärbung.

Was die Auffindung des Zellkerns in den nach medizinisch-bakteriologischen Vorschriften gefärbten Präparaten anbelangt, so war von vornherein nicht zu erwarten, daß bei der groben Behandlungsweise, welcher die Bakterienzelle bei jenem Verfahren ausgesetzt ist, der Zellkern, das empfindlichste Organ der Pilzzelle, sichtbar zu machen ist. Ich habe auch in keinem der zahlreichen Präparate ein solches Gebilde nachweisen können. Oft traten wohl kleinere oder größere, stärker als der übrige Zellinhalt gefärbte, kernähnliche Gebilde auf, für die jedoch in jedem Falle eine andere Deutung sicher zu geben war.

Ein absoluter Beweis konnte für die Annahme Arthur Meyer's, daß die von ihm mittels verschiedener Färbemethoden, besonders aber durch Formolfuchsin sichtbar gemachten Zellbestandteile Zellkerne seien, bis jetzt nicht erbracht werden, weil die Kleinheit der Organe eine weitergehende Untersuchung nicht zuläßt. Jedoch liefert A. Meyer (1899. p. 456) für die Zellkernnatur seiner Gebilde einen Wahrscheinlichkeitsbeweis, der jeden, falls man nicht überhaupt jenen kleinsten Lebewesen den Besitz des Zellkerns absprechen will, vorläufig befriedigen muß. A. Meyer führt aus, die von ihm gefundenen Körner können entweder protoplasmatische Organe oder ergastische Gebilde sein; letztere zeigen jedoch niemals untereinander eine solche Uebereinstimmung in ihrer Größe wie die Kerne, sind auch wohl nie in so konstanter Zahl

in Zellen bestimmter Größe vorhanden. Die Kerne treten ferner auf in den Keimstäben, in welchen Reservestoffe noch nicht gebildet, und in Sporangien, in welchen dieselben schon verbraucht sind. Demnach können die in Formolfuchsin sich rot färbenden Körner der Bakterien nur protoplasmatische Gebilde sein, und unter diesen von den bekannten nur der Zellkern. Besonders beweiskräftig ist jedoch ihr Erscheinen in der Sporenvakuole, woselbst um den Kern herum der weitere Aufbau der Spore sich vollzieht, wie es ja auch von anderen Pilzen sicher bekannt ist. Auch weist A. Meyer darauf hin, daß eine wechselnde Zahl von Kernen in Pilzzellen nichts Neues ist, welche Erscheinung merkwürdigerweise von A. Fischer (1897) als gegen die Zellkernnatur sprechend hervorgehoben wird. Die von früheren Autoren als Zellkerne aufgefaßten und beschriebenen Gebilde der Bakterien sind schon von A. Meyer (1897) kritisch besprochen worden und verweise ich auf diese Abhandlung. Von den später erschienenen, die Zellkernfrage berührenden Arbeiten sind die folgenden zu erwähnen. Nakanishi (1901) glaubt für eine große Zahl von Bakterien den Nachweis der Zellkerne erbracht zu haben. Obwohl das von ihm verwendete Färbeverfahren mit sehr verdünntem Methylenblau den von Arthur Meyer schon im Jahre 1897 für die Kernfärbung der Bakterien benutzten Färbemethoden „überaus“ ähnlich sieht, zeigen doch die Bilder ohne weiteres, daß die „Nakanishi'schen Kerne“ verschieden von denen A. Meyer's sind. Manche dieser Gebilde mögen wohl Zellkerne sein, andere aber sind es gewiß nicht. Zu letzteren gehören zunächst die blaugefärbten Körner in Spirillum volutans. Hätte Nakanishi zu diesem Präparat mehr Methylenblaulösung hinzugefügt, so würde er haben bemerken können, daß seine Kerne sich in dicke, die Zellwände erreichende, blaue Kugeln verwandelt hätten, daß sie Volutanskugeln sind. Andere der sogenannten Kernbilder, besonders die länglichen, geradezu fadenförmigen, werden einer central gelegenen Zellsaftvakuole ihren Ursprung verdanken. Diese Zellsaftvakuolen, welche bei verschiedenen Bacillen von mir häufig gesehen sind, erscheinen nämlich bei schwacher Blaufärbung und hoher Einstellung als dunkler gefärbtes längliches Gebilde, welches seitlich von einem helleren Saum umgeben ist; sie sind den von Schottelius (1888) gesehenen Kernen an die Seite zu stellen. Eine Aehnlichkeit seiner Kerne mit den Gebilden, die Schottelius sah, giebt Nakanishi selbst zu. Daß jedoch seine Kerne keine Vakuolen seien, will er durch Anwendung von verdünnten Säuren und Laugen, in welchen jene Kerne erhalten bleiben und aufquellen, während die Vakuolen sofort zerstört werden sollen, bewiesen haben. Es ist aber doch darauf hinzuweisen, daß keineswegs die Zellsaftvakuolen von verdünnten Säuren und Alkalien zerstört werden müssen. Eine Freilegung des Kernes beim Zerquetschen der Zellen von Spirillum volutans führt Nakanishi als weiteren Unterschied seiner Kerne von Vakuolen an. Ich habe schon darauf hingewiesen, daß die gefärbten Körper von Spirillum volutans eine ganz andere Bedeutung haben; es fällt dieser Vergleich somit in sich zusammen. Weitere Gründe Nakanishi's für die Kernnatur jener Gebilde sind 1) größere Affinität zum Farbstoff (die Definition dieses Verhaltens ist direkt aus A. Meyer. 1897, p. 227 übernommen); es ist jedoch bekannt, daß nicht nur eingetrocknete Vakuolen sich sehr gut im Gegensatz zum Cytoplasma färben, sondern auch unversehrte, in lebendfrischen Bakterien bei hoher Einstellung eine dunklere Farbe zeigen als der übrige Protoplast. 2) „Die Teilung der Bakterienzelle wird stets von derjenigen des

kernartigen Gebildes begleitet." Auch sollen sich jene Kerne schon ohne folgende Zellteilung teilen. Diese Erscheinungen sprechen ebensogut für Vakuolen. 3) „Größere Widerstandsfähigkeit", welche Eigenschaft jedoch ebenfalls die Vakuolen auszeichnen kann. Es liegt somit kein Grund vor, irgend eins der Nakanishi'schen Gebilde als Kern zu betrachten. Nicht der Besprechung wert sind die Angaben Feinberg's (1901) über Kerne, welche auf die blaurote Mischfärbung gewisser Protoplasmateile sich zurückführen lassen. Auch ich habe mittels der Romanowsky-schen Färbung (sowohl in der Ziemann'schen als auch in der Zettnow'schen Modifikation) ähnliche Bilder hervorrufen können. Auch die von Zettnow (1899) vermittels der Romanowsky'schen Mischfärbung hervorgerufenen größeren und kleineren, mehr oder weniger unregelmäßigen roten Flecke innerhalb der Bakterienzelle, die der Autor als chromatische Substanz auf Grund des eigenartigen Färbevermögens bezeichnet, können keine Kerne sein. Die von Vejdovsky (1900) im Innern von Crustaceen eines Alpensees gefundenen Bakterien, die als Parasiten teils frei im Lymphstrom, teils in Zellen eingeschlossen, diese cystenartig ausbauchend, jene Krebse bewohnen, zeigen alle einen central gelegenen, sehr großen Kern. Ueberhaupt zeigen diese „Bakterien" so eigenartige morphologische Verhältnisse, daß man sie zum Teil für Sporozoen oder deren Entwickelungsstadien halten möchte, die ebenfalls einen großen centralen Kern besitzen und eine gleiche Lebensweise führen. Teilungsstadien und Fadenbildung hat Vejdovsky nicht gesehen.

Da ich in dem von A. Meyer (1897 u. 1899) zum Studium der Kernfrage vorzugsweise benutzten B. asterosporus auch Volutanskugeln nachgewiesen habe, konnte es möglich sein, daß auch jene Beobachtungen auf einer Verwechselung mit jungen Volutanskugeln beruhten. Bei Prüfung dieser Frage gelang es mir aber, den Nachweis zu erbringen, daß der in der Sporenvakuole liegende Kern von den Volutanskugeln sicher verschieden ist. Herr Prof. Meyer meint, daß von den in seiner zweiten Arbeit (1899) abgebildeten Kernen einzelne Volutanskugeln gewesen sein können, da bei dieser zweiten Färbung eine verhältnismäßig kräftige Formolfuchsinfärbung angewandt wurde, während in der ersten Arbeit (1897) nur Rutheniumrot zur Verwendung kam und der Vergleich zwischen dem Kern der Sporenvakuole und den übrigen Kernen nur damals sorgfältig durchgeführt worden ist. Es gelang mir nie, innerhalb der Sporenvakuole eine Volutanskugel nachzuweisen, während Meyer gerade auf das Eintreten des Kernes in die Sporenvakuole das Hauptgewicht legt. Ferner konnte ich beobachten, daß von einer Anzahl der in Formolfuchsin gefärbten Gebilde nur ein Teil bei Methylenblaufärbung sich als Volutanskugeln erwies. Endlich fand Meyer auch bei B. tumescens, den er in seiner zweiten Arbeit vorzugsweise untersucht, die Kerne, und zwar nicht nur in den Oidien, sondern wieder besonders charakteristisch in den Sporenvakuolen der Sporangien. Ich konnte mich durch wiederholte Untersuchungen überzeugen, daß die Meyer'schen Kerne thatsächlich unschwer in den Sporangien von B. tumescens nachweisbar sind (Taf. I, Fig. IV *b*). Dagegen habe ich bei meinen sehr zahlreichen Untersuchungen, die ich an B. tumescens ausführte, niemals in diesem Bacillus Volutanskugeln gefunden.

b) Cytoplasma. Das Cytoplasma färbt sich im frischen wie im fixierten Zustande mit den angewendeten Anilinfarbstoffen kräftig und, abgesehen von einer nicht selten sichtbaren feineren Körnelung, auch gleichartig. Das Cytoplasma der Timotheebacillen zeigt die Eigentümlich

keit, den in heißem Karbolfuchsin aufgenommenen Farbstoff einer 5-proz. Schwefelsäure gegenüber während 10—15 Sekunden absolut festzuhalten und auch in verdünntem Alkohol ihn nicht abzugeben. Da die Thimotheebacillen, besonders diejenigen, welche älter als wenige Tage waren, ein eigenartiges, schon von vielen Untersuchern beachtetes und als zerhackt oder gegliedert bezeichnetes Aussehen nach der Ziehl'schen Karbolfuchsinfärbung besitzen, so war es erforderlich, nachzuweisen, ob die gefärbten Teile das Cytoplasma darstellen und die ungefärbten die Einschlüsse des Protoplasten, z. B. Fett, oder umgekehrt. Es wurde auch deshalb besonders nötig, weil die ungefärbten Stellen ein nur sehr schwaches Lichtbrechungsvermögen zeigten im Gegensatz zu den rotgefärbten Gliedern, welche stark lichtbrechend geworden waren. Es wurde zu dem Versuche Material von einer 13 Tage alten Glycerinagarkultur, welches zahlreiche und große Fettkugeln enthielt, verwendet. Die Fettkugeln färben sich mit Sudan III kräftig rot, die Stäbe selbst nur schwach. Ich ermöglichte es durch Zeichen, die ich an dem fixierten Deckglaspräparat anbrachte (Einkritzeln von feinen Linien mit dem Diamant oder durch Verreiben von angebrannten Watteteilchen mit dem Material), in vielen Fällen dieselben Stäbchen, die ich nach Färbung des Fettes mir genau gemerkt und gezeichnet hatte, auch nach der Ziehl'schen Färbung und Entfärbung wiederzufinden. Ich konnte so feststellen, daß die hellen, ungefärbten Lücken der Thimotheebacillen der Lage der Fetttropfen, die gefärbten und säurefesten Abschnitte dagegen der Lage des Cytoplasma entsprechen (Fig. X *h*). Untersuchungen am Bacillus der Geflügeltuberkulose hatten dasselbe Ergebnis. Durch diesen Befund wird das gegliederte Aussehen der Thimothee- und der Tuberkelbacillen, welches zu der früheren Annahme einer sogenannten Kokkenstruktur mancher Bacillen (z. B. des Tuberkelbacillus) Veranlassung gegeben hatte (Unna 1888), erklärt. In jungen Stäbchen, die etwa 3—6 Tage alten Kulturen entstammen, bemerkt man nicht selten kugelige, scharf begrenzte, dunkelrote Gebilde, die ich für durch Farbstoffaufnahme gequollenes Plasma halte. Die Grenzen der Zellwände werden von diesen Kugeln oft ausgebaucht und erscheint es mir nicht unmöglich, daß diese Ausbauchungen den schon am ungefärbten Präparate gesehenen Anschwellungen entsprechen. Diesen Gebilden, welche ich nur in Fuchsinpräparaten sah, entsprechen vielleicht die Kugeln, die Coppen-Jones (1895) beim Tuberkelbacillus gesehen hat und für sporenartige Gebilde hält. Coppen-Jones beschreibt sie als viel tiefer gefärbte, im Bacillus liegende Kugeln, deren Durchmesser öfter viel größer ist als der des Stäbchens. Sie sollen besonders widerstandsfähig gegen Säuren sein, die Neisser'sche Sporenreaktion geben, eine scharfe, glatte Kontur und starkes Lichtbrechungsvermögen besitzen. Ganz dieselben Eigenschaften fand ich auch bei den Thimotheekugeln. Daß diese jedoch sporenähnliche Gebilde sind, ist schon dadurch ausgeschlossen, daß sie nur in sehr jungen Kulturen auftreten, in älteren aber nicht mehr zu finden sind.

Nicht nur das Cytoplasma der Thimotheebacillen zeigt nach der Färbung mit Fuchsin einen Widerstand gegen Entfärbung durch Säuren, sondern auch das der Keimstäbe von B. tumescens und einiger anderer Erdbacillen (siehe p. 8 u. 171) ist durch diese Eigenschaft ausgezeichnet. Die Säurefestigkeit der Keimstäbe erreicht die der Thimotheebacillen bei weitem nicht, kommt ihr jedoch nach Färbung in der kochenden Karbolfuchsinlösung während mehrerer Minuten nahe (Fig. II *f*).

Sehr kräftig bleibt das Cytoplasma auch nach der Gram'schen

Methode bei B. tumescens, B. cohaerens und dem Thimotheebacillus gefärbt und zwar bei allen Entwickelungsstadien der untersuchten Bakterien. Es zeigen sich jedoch bei den Entwickelungsstadien von B. tumescens darin besondere Unterschiede, daß in wässerigem Alkohol sich zunächst das Cytoplasma der Sporangien, dann das der Ruhestäbe und zuletzt das der Keimstäbe entfärbt. Bei B. cohaerens trat die Entfärbung viel schneller ein und bei der untersuchten Spirillen- und Pseudomonas-Art färbt sich das Plasma gar nicht (vergl. Kapitel über Gram-Färbung).

Bei Verwendung erhitzter Farblösungen treten oft am Cytoplasma plasmolytische Erscheinungen auf (Fig. III *d*).

An in Kanadabalsam liegenden Präparaten erscheint das Cytoplasma besonders dunkel gefärbt, und wenn es mit erhitzter Farblösung behandelt war, geht es sogar in blau- bis schwarzrot über. Es wird mitunter zu dunkel gefärbten Punkten und Flecken zusammengeballt, die durch Bänder und Brücken von derselben Farbe miteinander verbunden sind (Fig. IV *m*).

II. Alloplasmatische Organe.

Hierher gehören nur die Geißeln, welche jedoch nach den von mir verwendeten Färbemethoden und Reagentien nicht in Erscheinung traten.

III. Ergastische Gebilde.

1) Fetttropfen. Am häufigsten trifft man von ergastischen, d. h. von der Zelle erarbeiteten Gebilden (A. Meyer 1896. p. 212) in den Bakterien Fetttropfen, welche als Reservestoffe gespeichert werden, an. Diese färben sich in der Regel mit den Anilinfarblösungen nicht. Sie sind als helle, mehr oder weniger scharf begrenzte Flecke, die bei weniger eingreifenden Färbemethoden, z. B. nach Färbung mit kalter Methylenblaulösung, sogar noch ganz weiß, rund und scharf berandet sein können, in geringerer oder größerer Zahl je nach dem Stadium der Entwickelung bemerkbar. Je länger erwärmte Farblösungen auf sie einwirken, je unregelmäßiger und verschwommener werden sie; besonders eingreifend wirkt Fuchsin. Auch nimmt das Fett in heißen Lösungen Farbstoff auf, eine Erscheinung, die besonders beim vorsichtigen Entfärben mit schwachen Säuren hervortritt. Es muß jedoch beachtet werden, daß die Farbe des umgebenden Cytoplasma auch als Deckfarbe auf die Fettvakuolen wirkt und dieselben tiefer gefärbt erscheinen läßt, als sie in Wirklichkeit sind. An in Kanadabalsam eingebetteten Präparaten erscheint das Fett noch dunkler, weil auch das gefärbte Cytoplasma sich um die Tropfen herum verdichtet hat und eine noch stärkere Deckfärbung hervorruft. Die Fettvakuolen werden nur durch hellere, sehr unregelmäßige und verschwommene Flecke angedeutet. Die Fetttropfen der Thimotheebacillen treten dagegen meist als scharf abgesetzte, ungefärbte Flecke auf selbst nach der Ziehl'schen Karbolfuchsinfärbung, wie ich nachwies (p. 51). Es hängt diese Verschiedenheit, die sich fast nur an älteren Stäben zu erkennen giebt, meiner Ansicht nach damit zusammen, daß die Fetttropfen der Thimotheebacillen eine im Verhältnis zum Zellumfang erhebliche Größe annehmen und auf allen Seiten ein solcher Tropfen der Membran fast unmittelbar anliegt. Eine Deckfärbung durch das gefärbte Plasma ist deshalb nicht möglich. Diese Fetttropfen waren es, welche auch im Tuberkelbacillus von vielen Beobachtern als rundliche oder ovale, lichtbrechende Gebilde gesehen sind, sogar schon

von Koch, der sie für Sporen hielt. Fischel (1892), der sie häufig in den keuligen Anschwellungen liegen sah, spricht ihnen die Bedeutung von „Gonidien“ zu. Dorset (1898), welcher Tuberkelbacillen im Sputum mit Sudan III in 80-proz. Alkohol (konzentrierte Lösung) rot färbte und zur Erkennung der Tuberkelbacillen im Gegensatz zu Smegmabacillen und anderen, welche sich nicht färben sollen, empfahl, sah eine perlschnurartige Rotfärbung und führt diese, allerdings ohne sicheren Beweis, auf das Vorhandensein von Fetttröpfchen im Innern der Bacillen zurück. Le Doux (1900) konnte mit Sudan die Tuberkelbacillen nicht differenzieren, was, nach meinen Beobachtungen am Thimotheebacillus zu schließen, auch wohl nur in gewissen Alterszuständen und Ernährungsverhältnissen der Bacillen möglich sein wird und auch dann nur, wenn das Fett in großer Menge auftritt.

Nach der Gram'schen Methode nehmen die Fetttropfen keine Färbung an; sie werden durch die Färbung des Plasma verdeckt, nur hier und da sieht man sie durchschimmern. Dagegen treten sie bei den Thimotheebacillen ebenfalls als weiße Lücken hervor, die man auch als Beweis für die Kokkenstruktur der Bakterien betrachtete. Nach einer Definition von Amann (1887) sollte der nach Gram gefärbte Tuberkelbacillus aus einer Reihe von 2—8 Kokken, die je von einer dichtanliegenden Hülle umfaßt sind, bestehen und das Ganze von einer ungefärbten Schleimschicht umfaßt sein. Aehnliche Auffassungen vertraten Lutz (1886) und Unna (1886) betreffs der Morphologie der Leprabacillen. Auch in diesen Fällen wird wahrscheinlich dem Vorhandensein von Fetttropfen jenes Bild zu verdanken sein.

Es scheint hier der Ort zu sein, die Untersuchungen von Bunge (1895) und Mühlschlegel (1899) über gewisse Inhaltsbestandteile von Bakterienzellen mit den Ergebnissen meiner Untersuchungen zu vergleichen und die Deutung jener Zelleinschlüsse zu berichtigen. Bunge sah in B. megatherium, B. anthracis und in einem unbekannten Bakterium im ungefärbten Präparat helle, stark lichtbrechende Körner, welche er nach einem besonderen Verfahren färbte (zunächst Vorbehandlung mit Chloroform 2 Minuten, dann 3 Minuten in Natriumsuperoxyd + Wasser, Abspülen in Wasser, mehrmaliges Aufkochen in Karbolfuchsin während 1 Minute, 15 Sekunden in 5-proz. Schwefelsäure, Nachfärbung mit 1-proz. wässeriger Methylenblaulösung während 1—2 Minuten). Diese Gebilde blieben rot gefärbt, während das Plasma die blaue Kontrastfarbe annahm. Bunge bezeichnet sie als Anfänge oder Vorläufer der Sporen. Mühlschlegel versucht an drei aus Getreide isolierten, sporenbildenden Bacillen, welche in jungen Kulturen und gerade unter den günstigsten Wachstumsbedingungen in ihrem Zellinnern stark lichtbrechende und scharf begrenzte Kügelchen enthalten, die Natur dieser Einschlüsse, der sogenannten Körner, zu ergründen. Er färbt die Körner nach dem Sporenfärbeverfahren von H. Moeller (1891), welches von dem Bungeschen nur insofern verschieden ist, daß an Stelle von Natriumsuperoxyd + Wasser 5-proz. Chromsäure verwendet wird. Auf Grund seiner Untersuchungen kommt Mühlschlegel zu dem Ergebnis, daß die Körner in morphologischer, biologischer und färberischer Beziehung einen sporenähnlichen Charakter besitzen und in ursächlicher Beziehung zum Aufbau der Spore stehen. Er hält sie für identisch mit den Bunge'schen Körnern.

Beim Betrachten der von Bunge und Mühlschlegel zu ihren Arbeiten gegebenen Tafeln drängte sich mir der Gedanke auf, daß die fraglichen Gebilde trotz ihrer kräftigen Rotfärbung mit Fettkugeln

identisch sein könnten. Gestalt, Größe, Lagerung innerhalb der Bakterienzelle und die Zeit ihres Auftretens vor der Sporenbildung sprachen dafür. Ich beschloß daher, diese Frage zu prüfen. Ich stand davon ab, den B. megatherium de Bary, der gegenwärtig nicht mehr zu identifizieren ist, zu untersuchen. Dagegen wählte ich unter den von Gottheil (1901) näher beschriebenen Fettbacillen B. tumescens Zopf und B. Ellenbachensis zum Versuch aus, weil diese dem B. megatherium der Bakteriologen am nächsten zu stehen scheinen. Ich verfuhr genau nach den von Bunge und Mühlschlegel gegebenen Vorschriften. Das Material wurde frischen Agarkulturen etwa 15—20 Stunden nach der Ueberimpfung des abgekochten Sporenmaterials, also zur Zeit der kräftigsten Fettspeicherung vor der Sporenbildung, entnommen. In den nach dem oben genannten Verfahren behandelten Präparaten konnte man nun die Fetttropfen größeren und kleineren Umfanges deutlich rot gefärbt sehen, während das Plasma die blaue Gegenfarbe angenommen hatte (Fig. III *h*). Ohne Nachfärbung mit Methylenblau sah man rote Kugeln und Punkte auf ungefärbtem Grunde (Fig. III *g*). Die Fetttropfen färbten sich um so deutlicher, je länger und heißer die Karbolfuchsinfärbung einwirkte. Daß das Fett den Farbstoff so intensiv aufnimmt, wie es beim Möller'schen und Bunge'schen Sporenfärbeverfahren der Fall ist, wird wahrscheinlich sowohl auf die Veränderung der Fettkugeln durch das starke Erhitzen als auch besonders auf die Verseifung durch die Natronlauge, welche sich sofort bei Wasserzutritt aus Natriumsuperoxyd bildet, zurückzuführen sein. Daß ferner die rote Farbe der Fetttropfen durch die Einwirkung der Schwefelsäure nicht zerstört wird, beruht wohl auf der Undurchlässigkeit des Fettes für die wässerige und kalt einwirkende Schwefelsäure. Alkohol (70-proz.) entfärbt dagegen die Kugeln. Die von Bunge bei B. megatherium beobachtete Erscheinung, daß jene roten Kugeln oft von einem ungefärbten Saum umgeben sind, habe ich bei B. Ellenbachensis auch gesehen; ich führe sie auf eine Aufblähung der Zellvakuole, in der der Fetttropfen liegt, zurück. Die Sporenanlagen, die ich mehrfach beschrieben und abgebildet habe, waren in 15—20 Stunden alten Kulturen von B. tumescens und B. Ellenbachensis noch auf keine Weise sichtbar zu machen. Fast ausnahmslos tritt in einer Zelle nur eine Sporenanlage auf.

Es ist somit durch diese Untersuchung erwiesen, daß die sogenannten Bunge'schen Körner keine Sporenanlagen, sondern Fetttropfen sind. Es ist von Bunge der Reservestoff, der zur Bildung der späteren Spore aufgebraucht wird, mit der Sporensubstanz selbst verwechselt. Mühlschlegel drückt sich betreffs der Bedeutung jener Gebilde vorsichtiger und, wenn man den negativen Ausfall der von ihm versuchten Reaktionen berücksichtigt, auch ganz richtig aus. Er sagt: „Es ist anzunehmen, daß sie zum Aufbau der Spore Verwendung finden.“ Bunge und Mühlschlegel hatten durch Behandlung mit Chloroform eine Mitfärbung von „Fett- oder Lecithintropfen“ vermeiden wollen, übersahen aber, daß ein Herauslösen der Fetttropfen aus den Bakterien selbst nach 24-stündiger Einwirkung von siedendem Chloroform unmöglich ist, welches Verhalten auf der Undurchlässigkeit der Membran für Chloroform beruht (Meyer 1899. p. 435). Manche von den Kügelchen, welche Ernst (1902) als Inhaltsbestandteile einer Reihe von Bakterien beschreibt und abbildet, sind sicherlich gleichfalls Fetttropfen, z. B. die Körner im wurzelförmigen Bacillus und im sogenannten megatherium.

Die vielen an der Außenfläche der Stäbchen klebenden Kügelchen sind vielleicht auch Fetttropfen, die von abgestorbenen und zerfallenen Bakterien der betreffenden Kolonie stammen, oder sie sind Verunreinigungen, Farbstoffausscheidungen oder Bestandteile des Nährbodens; jedenfalls sind sie nicht ein Bestandteil der Zelle, an der sie hängen. Ernst kann nicht entscheiden, welche Deutung den verschiedenartigen Körnern seiner Bacillen zukommen. Zweifellos wäre Ernst zu einem Resultat gekommen, wenn er seine Bakterien vorher nach den von Arthur Meyer erprobten Methoden untersucht hätte.

2) Glykogen. Dieser Reservestoff wird von vielen Bakterien ebenfalls vor der Sporenbildung gespeichert (siehe auch A. Meyer 1899 und Gottheil 1901). Ich habe sein Verhalten in gefärbten Trockenpräparaten an B. cohaerens untersucht.

In ungefärbten Präparaten ist dieses Kohlehydrat nicht zu sehen; tritt aber als braunrot gefärbte Masse bald hervor, wenn das Präparat mit verstärkter Jodjodkaliumlösung *sch* behandelt wird. In den Färbungen der frischen Präparate mit sehr verdünnten Farblösungen tritt das Glykogen kaum hervor; allenfalls ist in Methylenblaupräparaten seine Lage durch etwas hellere Flecken angedeutet.

In fixierten und mit starken Farblösungen behandelten Trockenpräparaten tritt das Glykogen als hell gefärbte und unregelmäßig gelagerte Masse innerhalb des Zellleibes hervor. Es gilt dies Verhalten sowohl für die Fuchsin- und Methylenblaufärbungen als auch für die Gram'sche Methode. Daß die hell gefärbten Stellen thatsächlich durch die sich nicht färbenden Glykogenmassen hervorgerufen werden, habe ich an ein und demselben Präparate mehrfach durch succedane Färbungen (Jodjodkalium, Ausspülen mit Wasser, Anilinfarbstoff) bei kontinuierlicher Beobachtung festgestellt. Daß die Stellen, an welchen Glykogen liegt, sich bis zu einem gewissen Grade zu färben scheinen, wird dadurch erklärlich, daß die Glykogenmassen mit Cytoplasma durchsetzt sind.

In den in Kanadabalsam eingebetteten Präparaten, in welchem durch das Eintrocknen die Stäbchen sich erheblich verschmälern (siehe p. 15), sieht man die auffallende Erscheinung, daß die mit Glykogen vollgestopften Zellabschnitte dieser Zusammenziehung einen Widerstand entgegensetzen. Diese Stellen des Bacillus bleiben dicker, das Glykogen zieht sich also nicht erheblich beim Eintrocknen zusammen. Dort, wo das Glykogen nur in kleinen Mengen abgelagert ist, wird jedoch die Zellform nicht verändert. Da es jedoch häufig sich nur an einem Pol befindet, sieht man ebenso oft Stäbchen mit keuligen Anschwellungen (Fig. VII *k*, *l*, *m*). Wird das Glykogen nur in der Mitte des Bacillus abgelagert, so entstehen besonders bei kürzeren Stäbchenformen bipolare Färbungen (Fig. VIII *b'*). Die Fig. IX *k* bezieht sich auf ein Glykogen speicherndes, noch unbestimmtes Bakterium, welches ich aus Pferdekot isolierte.

3. Volutanskugeln. Neben die Fett- und Glykogenvakuolen sind als dritte Art von Reservestoffvakuolen die Volutanskugeln einzureihen, deren Inhalt vielleicht aus Eiweißkörpern besteht. Ihre Reaktionen sind p. 38 ff. genauer auseinandergesetzt.

Im ungefärbten Zustande sind sie nur schwer als etwas lichtbrechende Kugeln zu erkennen, wenigstens bei den Bacillen, welche außer Volutanskugeln noch Fett führen. Jodjodkalium *sch* verändert sie nicht. Auch in Formolfuchsin färben sie sich nicht, allenfalls tritt bei Anwendung einer

stärkeren Fuchsinlösung eine rote Färbung ein. In Methylenblau nehmen sie eine tiefblaue bis blaurote Färbung an und schwellen dabei erheblich an. Zwischen den Volutanskugeln der Präparate mit frischem lebenden Material und den der fixierten Präparate besteht ein bemerkenswerter Unterschied nicht. Die Anwendung von erwärmter Farblösung ruft dagegen wesentliche Verschiedenheiten hervor. In erwärmter Fuchsinlösung, besonders Karbolfuchsin, färben sich die Volutanskugeln stärker und schneller als in kalter. In Methylenblaulösung, die nur bis zum Aufsteigen leichter Dämpfe erwärmt ist, tritt eine gute Färbung der Kugeln ebenfalls ein; steigt dagegen die Temperatur der Methylenblaufarblösung bis in die Nähe des Siedepunktes oder erreicht sie diesen, so verlieren die Kugeln ihre Blaufärbung sofort wieder. Es bleiben an Stelle der größeren Kugeln im blaugefärbten Cytoplasma weiße runde Flecke zurück; die kleineren werden dann meist durch die Färbung des Cytoplasma verdeckt.

Nach der Gram'schen Methode können die Kugeln nicht dargestellt werden, die Jodverbindung des Pararosanilins wird aus der Substanz der Volutanskugel leicht durch Alkohol herausgelöst. Die Färbung nach Ziehl (Säurefestigkeit) bringt ebenfalls die Kugeln nicht in Erscheinung, sie werden durch die 5-proz. Säure in kurzer Zeit gelöst. Bei Verwendung von nur 1-proz. Säure treten sie dagegen als rote Kugeln im farblosen Cytoplasma hervor.

4. Zellsaftvakuolen. Bei B. tumescens sind diese Gebilde nicht häufig; regelmäßig finden sie sich aber bei B. cohaerens. Bei beiden Species sind sie besonders gut in den Keimstäben, in welchen sie durch andere Einschlüsse noch nicht verdeckt werden, zu sehen. In frischen, nicht angetrockneten Präparaten zeigen sie sich meist erst durch Zusatz von Jodjodkalium. Sie sind dann bei hoher Einstellung dunkelgelb, bei tiefer hellgelb oder ungefärbt.

In fixierten, besonders in den mit heißen Farblösungen behandelten Präparaten treten sie bei hoher Einstellung als dunkel gefärbte, bei tiefer Einstellung als hell oder nicht gefärbte Körper hervor. In den Keimstäben von B. tumescens sah ich sie nur nach Behandlung mit der Ziehl'schen Färbung (bei hoher Einstellung schwarzrot, von einem hellen Hof umgeben, bei tiefer fast weiß). Da sie in Präparaten, die nach den gewöhnlichen Färbemethoden behandelt sind, nicht hervortreten, vermute ich, daß sie in kochender Farblösung durch das Quellen des Cytoplasmas verändert werden. Selten sah ich sie in Ruhestäben von B. tumescens (Fig. III *b*) (bei hoher Einstellung).

(Schluß folgt.)

Ueber die Bedeutung der Calciumsalze für Bakterien.

Von **G. Gabritschewsky.**

Die Frage der physiologischen Bedeutung des Calciums für Pflanzen kann bis heute nicht als nach allen Richtungen abgeklärt gelten. Nach allgemeiner Ansicht der Botaniker ist für chlorophyllhaltige Pflanzen die Anwesenheit von Calcium unter den mineralischen Nährstoffen unbedingt notwendig. In Bezug auf Schimmel- und Hefepilze sind die Ansichten der Gelehrten schon weniger im Einklang, und, was Bakterien anbetrifft, so giebt es sogar nur wenige Anhaltspunkte, auf die man sich bei Beurteilung dieser Frage stützen könnte.

Winogradsky[1]), Loew[2]), Molisch[3]), Benecke[4]) und Wehmer[5]) sind der Ansicht, daß für Schimmel- und Hefepilze ein Zusatz von Calciumsalzen zu den Nährmedien belanglos und darum zwecklos sei. Wehmer bemerkt jedoch beiläufig, daß Untersuchungsresultate, welche bezüglich bestimmter niederer Pilzarten erlangt sind, sich nicht ohne weiteres verallgemeinern lassen, und daß vielleicht für einige derselben Calciumsalze doch von Bedeutung sind.

Lafar[6]) weist darauf hin, daß die allgemeine Ansicht der Botaniker über diesen Gegenstand mit den Erfahrungen der Bierbrauer, nach welchen Hefekulturen mit geringem Calciumgehalt schwache Gärung entfalten, im Widerspruch stehe. Deswegen hat sich bei den Bierbrauern die praktische Methode ausgebildet, zu weichem Wasser 10 g Gips pro $^1/_2$ l Würze zuzusetzen. Lafar vereinbart den Widerspruch zwischen Botanikern und Bierbrauern und behauptet, daß die Vermehrung der Hefepilze auch ohne Calcium vor sich gehen könne, daß dagegen für den Gärprozeß Calcium notwendig sei und daß außerdem Calcium die giftige Oxalsäure binden könne.

Was speziell Bakterien anbetrifft, so wissen wir, daß Nährlösungen von Mineralsalzen gewöhnlich auch Calcium enthalten (Pasteur, Naegeli, Uschinski, Gamaleïa, C. Fraenkel, Brieger u. A.), aber in einigen Fällen ist auch ein Wachstum von Bakterien ohne Calciumzusatz als möglich erwiesen worden. So haben z. B. Proskauer und Beck[7]) Kulturen des Tuberkelbacillus auf einem Nährmedium ohne Calciumzusatz erhalten.

In solch einer unbestimmten Lage befindet sich gegenwärtig die Frage der physiologischen Bedeutung des Calciums für Bakterien, und darum muß man sich der von J. Schmidt und Weis[8]) ausgesprochenen Meinung anschließen, daß diese Frage endgiltig nicht entschieden sei, und daß vielleicht für verschiedene Bakterien der Bedarf an Calcium auch variiere.

Die unten mitgeteilten Kultivierungsversuche von Bakterien auf Nährböden mit partieller oder totaler Entfernung des Calciums bestätigen

1) Botan. Centralbl. Bd. XX. 1884.
2) Flora 1892.
3) Sitzungsber. der Wiener Akad. Math.-naturwiss. Kl. Bd. CIII A. I. 1894.
4) Berichte der deutsch. botan. Gesellsch. 1894.
5) Berichte der deutsch. botan. Gesellsch. 1895.
6) Technische Mykologie 1901.
7) Zeitschr. f. Hygiene. Bd. XVIII. 1894.
8) Die Bakterien. 1902.

ebenfalls die Notwendigkeit eines systematischen Studiums der angeregten Frage, weil bereits bei diesen vorläufigen Versuchen einzelne positive Ergebnisse resultieren.

Die Ausscheidung und Entfernung des Calciums aus den gewöhnlichen Nährmedien kann auf mannigfache Weise bewerkstelligt werden. Calcium wird aus Lösungen durch oxal- und fluorsaure Salze, Seife und kohlensaure Alkalien gefällt. Fluorsaure Salze, Seife und Kohlensaure Alkalien können in überschüssiger Menge als desinfizierende Substanzen auf Bakterien schädlich einwirken, und aus diesem Grunde habe ich vornehmlich neutrale Oxalate benutzt, welche ich für Bakterien als unschädlich betrachtete, um so mehr als in der Litteratur eine direkte Angabe in diesem Sinne sich vorfand.

Schon lange ist die giftige Wirkung der Oxalsäure und ihrer Salze auf Menschen und Tiere (Kobert, E. v. Vietinghoff-Scheel) sowie auch auf chlorophyllhaltige Pflanzen (Migula, Schimper und Loew) bekannt, aber für niedere chlorophylllose Pflanzen (Schimmel- und Hefepilze, Bakterien) haben sich Oxalate nach Untersuchungen von Loew als unschädlich erwiesen. So z. B. ist in einem seiner Versuche die Gärthätigkeit der Bierhefe nach Zusatz von 4 Proz. Kaliumoxalat zu der Gärflüssigkeit nicht im geringsten beeinträchtigt worden. Diese Beobachtung von Loew wird auch von E. v. Vietinghoff-Scheel[1]) bestätigt. Außer den Versuchen mit Kali- und Natronoxalat stellte ich noch einige Versuche mit Nährlösungen von Mineralsalzen mit verringertem Calciumgehalt und mit Nährmedien, in denen das Calcium nicht durch Oxalate, sondern durch Kohlensäure und nachträglichen Zusatz von kohlensauren Alkalien gefällt war, an.

Zu gewöhnlicher alkalischer Bouillon, Gelatine und Agar setzte ich sterilisierte 2-proz. Natronoxalatlösung in verschiedener Proportion 0,1—1,0 ccm pro 5,0 ccm Nährmedium zu, was 0,04—0,4 Proz. Natronoxalat ausmachte. Nach Erwärmung im Wasserbad und Umrührung des Mediums mit dem Natronoxalat wurde oxalsaures Calcium in typischen Krystallen ausgefällt. Auf derartige trübe Nährböden wurden nach Abkühlung verschiedene Bakterien übertragen und gleichzeitig auf die nämliche Weise Kontrollkulturen angelegt. Der Versuch mit Bouillon zeigte, daß ein Zusatz von 0,1—0,12 Proz. Natronoxalat zum Nährmedium hinreichend ist, um auf diese Weise alles Calcium zu fällen, wenn man das Ausbleiben einer Trübung nach Zusatz eines weiteren Quantums Natronoxalat zur sedimentierten Bouillon als Kriterium benutzt. Es muß bemerkt werden, daß der Calciumgehalt des Wassers und der Nährmedien in verschiedenen Laboratorien varieren kann und daß darum die zur totalen Fällung des Calciums erforderliche Natronoxalatmenge bei exakten Untersuchungen zuvörderst bestimmt werden muß.

Ist ein Ueberschuß von Natronoxalat vorhanden, so kann man auch dann schwerlich die Gewißheit haben, daß alles Calcium in eine unlösliche Verbindung übergeführt ist, denn Calcium in Komplexverbindung mit Peptonen und anderen Eiweißsubstanzen wird auf solche Weise nicht gefällt. Zudem wird bei der von uns gewählten Versuchsanordnung noch eine andere Möglichkeit von vornherein zugelassen, nämlich eine partielle Auflösung des Calciumoxalates durch Säuren als Stoffwechselprodukte einiger Bakterien. Aus diesen Ausführungen geht hervor, daß mit oxalsaurem Natron behandelte Medien, streng genommen, nur hypocal-

1) Archives internationales de Pharmakodynamie et de Thérapie. 5. August 1901.

cinierte und relativ decalcinierte genannt werden dürfen. Auf derartige Nährmedien wurden verschiedene, doch vornehmlich pathogene Bakterien geimpft, wobei folgende Abweichungen vom normalen Wachstum beobachtet wurden. Alle geprüften Bakterien, mit Ausnahme der Pseudodiphtherie- und Diphtheriebacillen wachsen sogar bei dem größten Natronoxalatgehalt (0,4 Proz.) der Nährmedien. Zwischen Pseudodiphtherie- und Diphtheriebacillen kann ihrerseits ein Unterschied konstatiert werden; letzterer war bei unseren Versuchen besonders nach Zusatz von 0,3 ccm 2-prozentigen Natronoxalates (0,12 Proz.) zu den Nährmedien (Bouillon und Agar) ausgeprägt. Fünf Kulturen des Pseudodiphtheriebacillus verschiedener Herkunft auf solchen Nährböden zeigten entweder gar kein Wachstum im Verlauf von 24—48 Stunden oder ein im Vergleich mit drei Diphtheriebacilluskulturen äußerst geringes. Bei größerem Zusatz von Natronoxalat beginnen auch Diphtheriebacillen schwach zu wachsen. Man kann schon a priori voraussetzen, daß es einzelne Kulturen geben wird, welche an der Grenze zwischen diesen beiden Bakterienspecies stehen werden, doch in der Mehrzahl der Fälle ist obiges vermutlich die Regel, und diese Beobachtung giebt uns folglich ein neues Hilfsmittel zur differentiellen Unterscheidung von Diphtherie- und Pseudodiphtheriebacillen in die Hand. Leider wird auf Pferdeserum nach Zusatz einer Natronoxalatlösung vor der Gerinnung die geschilderte Wachstumsdifferenz nicht erzielt, wahrscheinlich aus dem Grunde, weil das Calcium nicht in so vollständigem Maße gefällt werden kann, wie es in anderen Nährmedien der Fall ist.

Der Wachstumsunterschied der Diphtherie- und Diphtheriebacillen bleibt auch dann aus, wenn man das hypocalcinierte Nährmedium nicht mit Natronoxalat, sondern anderswie zubereitet. Läßt man durch Bouillon Kohlensäure bei Erwärmung im Wasserbade, so fällt bei nachträglichem Alkalizusatz ein beträchtlicher Teil des Calciums als Karbonat aus. Solche vom Bodensatz abfiltrierte Bouillon ist entschieden hypocalciniert und nichtsdestoweniger entfaltet der Diphtheriebacillus darauf ein gutes Wachstum. Bei einem anderen Versuche wurde zur Uschinski-schen, ohne Calcium zubereiteten Lösung von Mineralsalzen gewöhnliche Bouillon in verschiedenen, geringen Mengen zugesetzt und auf diese Weise ein Nährmedium gewonnen, dessen Calciumgehalt 10—50 Mal geringer ist als der der gewöhnlichen Bouillon. Diphtherie- und Pseudodiphtheriebacillen zeigten auch hier ein gutes Wachstum. Auf Uschinski'schen Nährmedien ohne Calcium wurden überhaupt keine Kulturen erhalten.

Eine andere Eigenart im Wachstum der Bakterien kam scharf gekennzeichnet auf Gelatine zum Vorschein, wo Stichimpfungen von Bac. anthracis, Bac. pyocyaneus, Bac. viridis und Staphylococcus pyogenes aureus bei Zusatz von 0,3 und darüber Kubikcentimeter 2-proz. Natronoxalatlösung Kulturen mit Pigmentbildung, aber mit sehr unbedeutender Verflüssigung der Gelatine ergaben; die Ursache davon liegt entweder in geschwächter Produktion von tryptischem Enzym oder darin, daß die Wirkung des letzteren bei Abwesenheit von gelösten Calcium gehemmt ist. Letztere Hypothese stützt sich auf eine Reihe von Thatsachen, welche beweisen, daß Calcium zur Lebensthätigkeit einiger Enzyme tierischer und pflanzlicher Herkunft notwendig sei (Hammarsten, Arthur, Effront, Moraczewski und Duclaux). Doch ist es sehr wahrscheinlich, daß in unseren Versuchen der Ueberschuß von Natronoxalat auf die Bakterien schädigend einwirkt und ihre zymogene Funktion hemmt. Wenigstens in einem Versuche mit einer Bac. pyocyaneus Kultur

wurde nach Abtötung derselben durch Toluol sowohl normale Gelatine als auch solche mit Zusatz von Natronoxalat auf gleiche Weise verflüssigt.

Was die Toxinbildung in hypocalcinierter Bouillon anbetrifft, so haben meine bisherigen Untersuchungen noch keine bestimmten Resultate ergeben. Bei Steigerung der Natron- oder Kaliumoxalatmenge welch letzteres ich in 10-proz. Lösung 0,25—0,5—1,0 ccm pro 5,0 ccm Nährmedium (0,5—1,0—2,0 Proz.) zusetzte, zeigt die Mehrheit der untersuchten Bakterien, wie z. B. Staphylococcus pyog aur., Bac. pyocyan., Bact. coli comm., Bac. typhi abdom. und andere fast das gleiche Wachstum wie in den Kontrollröhrchen. Doch ist die Pigmentbildung mehr oder weniger geschwächt. Es muß bemerkt werden, daß diese verringerte Produktion von tryptischem Enzym und Pigment nicht auf Rechnung des stärkeren Salzgehaltes der Nährmedien nach Zusatz von Natronoxalat gestellt werden kann, denn zu den Kontrollmedien wurde Chlornatriumlösung in osmotisch äquivalenter Menge zugesetzt.

Bei Zusatz von glycerinphosphorsaurem Calcium zu decalcinierten Medien erzielt man wohl eine Besserung der Eigenschaften dieser Nährmedien, nicht aber eine vollständige Restitution.

Vergleichsweise wurden auch Versuche mit hypercalcinierten Nährmedien angestellt, indem durch Chamberland-Kerze filtrierte 2-proz. Lösung von glycerinphosphorsaurem Kali zugesetzt wurde. Diese Versuche zeigten im allgemeinen, daß eine Hypercalcination der Nährmedien für viele Bakterien das Wachstum fördert. Doch giebt es auch in dieser Richtung für jede Bakterienspecies ein bestimmtes Optimum der Calciummenge, über welches hinaus eine Schädigung möglich ist. Diese Frage der Hypercalcination der Nährmedien erfordert auch noch ein eingehenderes Studium.

Wenden wir uns wiederum der Wirkung der Oxalate auf Bakterien zu, so müssen wir konstatieren, daß Loew's Behauptung von der Unschädlichkeit dieser Salze für Bakterien eine gewisse Einschränkung erfordert, weil für einige derselben (Diphtherie- und Pseudodiphtheriebacillen) eine Hemmung der Vermehrung bei verhältnismäßig unbedeutendem Natronoxalatgehalt zum Vorschein kommt, und weiter bei größeren Oxalatmengen eine Schwächung der zymogenen Eigenschaften der Bakterien beobachtet wird.

Wirft man nun die Frage auf, wie eine derartige schädigende Wirkung der neutralen Oxalate zu erklären ist, so kann man gegenwärtig keine begründetere Erklärung als die, welche von Loew in Bezug auf die Giftwirkung dieser Salze auf chlorophyllhaltige Pflanzen (Algen) gegeben ist, finden. Diese Salze erweisen sich als giftig, weil sie das in den Zellen enthaltene und für das lebende Protoplasma notwendige Calcium in unlösliches Calciumoxalat überführen. Je mehr eine Pflanze Calcium bedarf, desto giftiger sind für dieselbe die Oxalate, und umgekehrt. Der Calciumbedarf der Bakterien ist ein minimaler, oder dieser Ingredient kann vielleicht gänzlich im Nährmedium fehlen, und darum ist es verständlich, daß die schädigende Wirkung der Oxalate auf Bakterien im allgemeinen recht schwach ausgeprägt ist. Im Einklang mit dieser Hypothese steht auch die Thatsache, daß die Salze der nächststehenden Säuren derselben Reihe, der Malon- und Bernsteinsäure, welche, wie bekannt, Calcium nicht fällen, in unseren Versuchen als unschädlich für Bakterien sich erwiesen. Andererseits erweisen sich die neutralen Salze der Fluor-, Citronen- und Weinsäure, welche die Eigenschaft besitzen, Calcium aus Lösungen zu fällen, als mehr oder wenig giftig (Effront, E. v. Vietinghoff-Scheel).

The influence of alcoholic intoxication upon certain factors concerned in the phenomenon of haemolysis.

[From the Laboratory of Hygiene, University of Pennsylvania.]

A preliminary report[1]).

By **A. C. Abbott**, M. D., and **D. H. Bergey**, M. D.,
Professor of hygiene and bacteriologie. first assistant, laboratory of hygiene.

In 1896 one of us (A. C. A.) published the results of an investigation upon the influence of alcoholic intoxicatien upon the resistance of rabbitts to infection[2]). In that paper attention was directed to the fact that the susceptibility of rabbits to certain types of infection was markedly increased through the influence of prolonged alcoholic intoxication. Since then these results have been fully confirmed by others[3]).

At the time the results were published no fully satisfactory explanation of the mechanism of this phenomenon was available, though several suggestions were offered, viz-the reduzed resistance may be referable to the local action of the alcohol upon the gastric mucous membrane, thereby impairing the nutrition of the animal to such an extent as to create conditions analogous to starvation, a state in which susceptibility is also seen to be increased; or to a diminution in the alkalinity of the blood through the acids resulting from the oxidation of the alcohol, (such reduction in alkalinity, thoug slight, has since been shown by Laitinen[4]) to occur); or to the remote action of the alcohol on the nervous system. The value of neither of these hypotheses was, however, susceptible of ready determination, so that the matter rested for a time.

During the past three or four years a series of brilliant investigations, especially by Bordet, Buchner, Metschnikoff, Ehrlich and Morgenroth and their associates, upon certain reactions peculiar to the blood and other fluids of the body have acquainted us with many hitherto obscure and unknown physiological phenomena. One of these newlydiscovered blood reactions seemed especially adapted to the solution, in part at least, of our problem, viz., that of haemolysis.

We undertoock therefore to determine: a) The influence of alcohol, administered per os, upon the complement content of the blood of rabbits. b) The influence of alcohol, similarly administered, upon the specific blood reactions of rabbits already artificially immunized against an alien blood. c) The influence of alcoholization upon the process of artificial immunization by an alien blood.

---

1) The influence of alcohol, administered per os, upon the complement content of the blood of rabbits.

The influence of alcoholic intoxication upon the complement content of the blood was determined by subjecting rabbits to daily doses of

1) Submitted for publication June 17th. 1902.
2) See Journal of Exp. Med. 1896. Vol. I.
3) See Laitinen — Acta Societatis Scientiarum Fennicae. Tom. XXIX. 1900. No. 7. — Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. Bd. XXXIV. 1900. p. 206.
4) l. c.

alcohol varying in amount from 3,5 to 10 cc of absolute alcohol, diluted with an equal volume of distilled water, for varying periods of time ranging from 1 to 67 days. The total amount of alcohol administered to individual rabbits during the time under treatment ranged from 10 cc to as much as 380 cc of absolute alcohol. In all 25 rabbits were used in this experiment.

The haemolytic immune sera used in these experiments were obtained subjecting rabbits to repeated injections of fresh, defibrinated bovine blood; the injections being made either subcutaneously or intraperitoneally. The degree of immunity attained in these animals was never very high, the idea being to immunize them to such a point that definite haemolysis would be obtained with 0,01 to 0,05 cc of the undiluted serum.

The haemolytic tests were carried out in small test tubes containing each one cubic centimeter of a 5 % suspension of bovine blood corpuscles (washed three times and suspended in 0,85 % sodium chloride solution); using 0,05 of the heated immune serum in each tube, to which was added a definite amount of reactivating serum ranging from 0,0025 to 0,03 cc. One series of tubes containing the heated immune serum was reactivated with the serum of a normal rabbit while another and similar series was reactivated with the serum of an alcoholized rabbit. These tubes were then placed in the thermostat at 37° C for 2 hours and subsequently for 18 to 24 hours in an ice chest. They were then compared with each other and the reduction in complement in the serum of the alcoholized rabbit was determined by noting the amount of reactivating serum required to produce definite haemolysis in both series.

As in the case of the investigation of 1896 (by A. C. A. l. c.) the results of our studies lack uniformity. Considering the individual peculiarities of the animals, especially their varying susceptibilities to alcoholic intoxication and the variations in the normal amount of complement contained in their circulating blood, it would have been surprising had they been otherwise. The serum of a small proportion of the alcoholized rabbits showed no reduction in its haemolytic content, but in general a definite reduction amounted to as much as 125 % of the amount found in the blood of normal rabbits.

---

2) The influence of alcohol, similarly administered, upon the specific blood reactions of rabbits already artificially immunized against an alien blood.

Four rabbits immunized against bovine blood were subjected to alcoholization, while four other immune rabbits were used as controls. The blood of these animals was tested as to its haemolytic powers before an after heating to 56° C for 30 minutes.

In the blood of the alcoholized immune animals it was possible to demonstrate not only a marked diminution in complement but also a decided diminution in the specific receptor as compared with the blood of a control immune animal.

---

3) The influence of alcoholization upon the process of artificial immunization by an alien blood.

A series of three rabbits received 125 cc each of absolute alcohol (diluted) during a period of about a month and were then injected with bovine blood corpsucles washed three times with 0,85 % sodium chloride solution. One of these animals died from an acute infection after the first injection of the alien blood, while the other two animals died after the third injection. A normal control animal received similar amounts of the same blood without showing any effect, while another control animal succumbed to an intercurrent infection during the process of immunization.

Another series of three rabbits received 155 cc of absolute alcohol (diluted) during a period of about a month and were then subjected to the immunization against washed alien blood. One of these animals died after the first injection of blood while the other two died within two hours after the second injection, Two control rabbits received similar amounts of the same blood without showing any ill effects.

We regard these results, though few in number, as confirmatory of those of our test tube experiments. They also seem to be in accord with the results of Deléarde (Ann. de l'Inst. Pasteur. T. XI. 1897) who found that it is difficult or impossible to immunize alcoholized animals against rabies, tetanus and anthrax; those of Laitinen (l. c.) who found that alcoholized animals are distinctly more susceptile to acute and chronic infections, such as anthrax and tuberculosis, and to intoxication by diphtheria toxin; those of Vagalussa and Raneletti (Ann. d'Ig. sp. Vol. IX. p. 118) who also found that alcoholized animals are more susceptible to diphtheria toxin than normal animals, and those reported by one of us (l. c.) in 1896.

We also carried out a series of bactericidal tests with the sera of the animals under experiment. Our results, however, were so discordant that it is impossible to draw any conclusions from them as to the relation of the haemolytic complement to bacteriolysis. The test culture employed in these experiments was B. coli communis.

Our results seem to warrant the following conclusions:

1) The daily administration of alcohol per os to rabbits, brings about a reduction in their circulating blood of the haemolytic complement.

2) The administration of alcohol to rabbits induces not only a marked reduction in the complement content of their blood but may cause, at the same time, a reduction in the specific haemolytic receptor in the blood of rabbits immunized against an alien blood.

3) The diminished complement content of the blood of alcoholized rabbits renders the animal more susceptible to the toxic action by an alien blood [1]).

1) A detailed report of our investigation will appear in the September (1902) number of the University of Pennsylvania Medical Bulletin.

Leuconostoc hominis und seine Rolle bei den akuten exanthematischen Krankheiten (Scharlach, Masern, Flecktyphus).

Von Prof. Dr. **Hlava**,
Vorstand des k. k. böhmischen pathol.-anat. Institutes in Prag.

Mit 6 Figuren.

Am 14. März dieses Jahres machte ich in der böhmischen Akademie die vorläufige Mitteilung von dem Funde eines Leuconostoc beim Menschen. „Zu diesem Befunde kam ich auf folgende Weise: Die Kettenkokken sind einer der häufigsten Begleiter von exanthematischen Krankheiten, wie ich mich selbst zu wiederholten Malen überzeugte. So beschrieb ich Kettenkokkenbefunde bei Scarlatina, Morbillen, Variola, Typhus exanthematicus und Typhus abdominalis[1]), die ich als sekundäre Invasion deutete, schon in den Jahren 1887—1889. Auch in der Epidemie (Scharlach und Masern) im Jahre 1901 fand ich in dem Leichenmaterial nur Kettenkokken. Da nun die Kettenkokken schon von Babes, Klein, Edington und letzterzeit auch von Class, Gordon, Baginsky für Scarlatina geradezu als spezifisch bezeichnet wurden, D'Espine-Marignac, Kurth, Gordon den Streptococcus scarlatinae als einen von den anderen Streptokokken sich unterscheidenden Kettencoccus kennzeichnen (Streptococcus conglomeratus Kurth, milchgerinnender Kettencoccus D'Espine), so legte ich mir die Frage vor, ob durch Kultivation der Scharlachkettenkokken auf den verschiedensten Nährböden nicht solche Merkmale zu finden wären, die charakteristisch für diesen wären. Ich nutzte bei der letzten Scharlachepidemie vom Oktober 1901 bis zum heutigen Tag das Material (Tonsillenbelag und Blut vom Lebenden, Blut und Organe von an Scharlach Gestorbenen) in dieser Hinsicht aus.

Zur Anwendung kamen einesteils die gewöhnlichen alkalischen Nährböden, andererseits saure (Milchsäurezusatz); dann wendete ich Nährböden an, die für Hyphomyceten angegeben sind, und endlich solche mit Milch- oder Zuckerzusatz, und zwar verwandte ich die verschiedensten Zuckerarten. Ich will von der großen Reihe nicht charakteristischer Befunde auf den verschiedensten Nährboden absehen und gleich erwähnen, daß bei Uebertragung von Tonsillenbelag (Scarlatina) sowohl auf Bouillon mit hochprozentigem Saccharosezusatz als auch auf Agar mit demselben Zusatze Kolonieen heranwachsen von Diplokokken und Diplostreptokokken, die eine homogene Hülle hatten, gerade wie der Leuconostoc mesenteroides. — Einige Stämme Eiterstreptokokken oder Streptokokken aus Blut bei Septikämie und Erysipel wuchsen auf diesen

1) Hlava, J., O haemorrhagické infekei. [Ueber hämorrhagische Infektion.] (Archives bohèmes de médecine. T. I. 1887. — Další přispěvky o haemorrhagické infekci. [Weitere Befunde über hämorrhagische Infektion.] (Ibidem T. II. 1888.) — O významu mikroorganismu při variole. [Ueber die Bedeutung der Mikroorganismen bei Variola.] (Ibidem T. II. 1888.) — Studie o tyfu exanthematickém. [Studie über Flecktyphus.] (Ibidem T. III. 1889.) — Scarlatina a Morbilli. [Vortrag auf dem III. Kongreß böhmischer Aerzte in Prag 1901.] (Věstník III. sjezdu č. lék. 1901.)

Nährböden nicht, oder nur spärlich und bildeten keine Dextranhülle wie der Scharlachkettencoccus."

Da nun meine Studien wenigstens teilweise abgeschlossen sind, erlaube ich mir, über die weiteren Resultate zu berichten.

Am besten gedeiht unser Leuconostoc (Fig. 1) in Zopf'scher Bouillon [1]) oder Saccharoseagar [2]), oder auf Zuckerrübenagar. In Saccha-



Fig. 1. Schnitt durch eine Leuconostockolonie in Zuckeragarkultur. Schwache Vergrößerung.

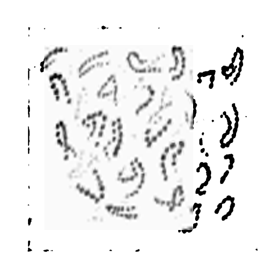


Fig. 2. Leuconostoc hominis aus Zopf'scher Bouillon (Scharlach).

rosebouillon, insbesondere in Zopf's Bouillon, bildet sich bei 37° C nach 12—24 Stunden eine schleierartige weißliche Membran, die allmählich kompakter wird und nach einigen Tagen sich zu Boden setzt und einen gelatinösen, später fast knorpelharten Niederschlag bildet. Manchmal beginnt die Membranbildung an den Wänden der Eprouvette, und zwar strahlen von einzelnen krümligen Punkten bandartige Streifen in die Höhe; immer bleibt die Flüssigkeit ganz klar und zeigt nach einigen Tagen eine stark saure Reaktion, was sich bei anfänglichem Lackmuszusatz makroskopisch verfolgen läßt, die insbesondere in Petruschky's Molke äußerst deutlich ist. Es zersetzt der Leuconostoc die Saccharose unter Milchsäurebildung.

Auf Kandiszuckeragar bilden sich recht charakteristische Kolonieen. War das Material gut ausgebreitet (mittels sterilisierter Glasstäbchen auf Petri'schen Schalen), so entwickeln sich bei 37° C eigentümliche, halbkugelige, himbeerartige, glasige Kolonieen, die, fest in den Nährboden eingewachsen, über das Niveau hervorragen. Allmählich werden die Kolonieen härter (es bildet sich ein harter, brauner Saum in der Peripherie) und lassen sich schwer abnehmen und zerreiben. Bei frischen Kulturen sind die Kolonieen leichter zu zerreiben.

Untersucht man mikroskopisch diese Kulturen in Zopf'scher Bouillon und Saccharoseagar, so finden wir zunächst eine ausgesprochene Membranbildung, in welcher einzelne Kettenkokken oder Kettenkokkenfamilien eingebettet liegen (Fig. 1 u. 2). Die Kettenglieder sind kurz, bestehen zumeist aus Diplokokken oder Diplokokkenketten (Fig. 3) von

---

1) Wasser 1000, weinsaur. Ammon 10, Monokaliumphosphat 5, Magnesiumsulfat 2,5, Tricalciumphosphat 0,5, Pepton 10, Kandiszucker 140.

2) Die vorige Zusammensetzung + 2 Proz. Stangenagar.

rundlicher Form, oder auch, gerade wie der Streptococcus, aus rundlichen oder scheibenförmigen Kettenreihen (Fig. 6), die aber auch ovoide

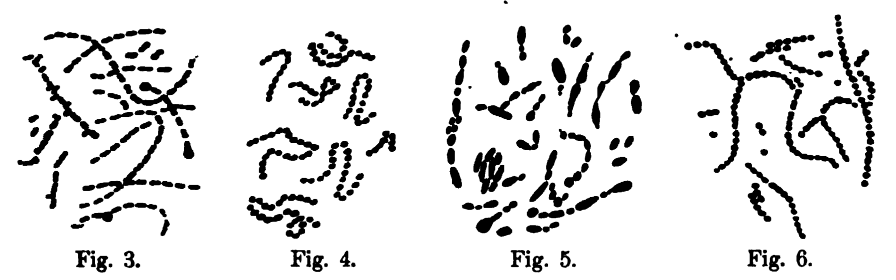


Fig. 3. Fig. 4. Fig. 5. Fig. 6.

Fig. 3. Leuconostoc hominis aus Morbillenblut (Diplostreptokokkenreihen).
Fig. 4. Nackter Leuconostoc hominis aus Scharlach im Ausstrichpräparat.
Fig. 5. Leuconostoc hominis aus Scharlach aus Zopfagar (Degenerationsformen: ovoide und bacillenähnliche).
Fig. 6. Leuconostoc hominis aus Morbillen in Malzbouillon.

Form annehmen, ja einzelne Glieder sind groß ovoid, bauchig, länger, gestreckt und nehmen deutlich Stäbchenform an. Der Pleomorphismus in älteren Rassen, die sich auch dadurch von den jüngeren Rassen unterscheiden, daß die Kolonieen auf Saccharoseagar eine mehr schleimige Hülle bilden, ist ungemein reichlich, man sieht Wetzsteinformen, große Ovoidketten, bauchige, lanzettförmige Bakterienformen, die wohl Involutionsformen sein werden.

Die homogene Hülle, in welche diese Kettenbakterien eingebettet sind, giebt nach mehrtägigem Auswaschen in Alkohol und destilliertem Wasser schöne Rotfärbung mit frisch bereiteter Fehling'scher Lösung ebenso wie auch mit der Lösung von Soldaini. Ueberimpft man den Leuconostoc auf andere zuckerhaltige (wie maltose-, traubenzuckerhaltige) Nährböden, so verliert er die Hülle, wird nackt, wie der Leuconostoc mesenteroides. Auf neutralem und schwach alkalischem Fleischpeptonagar kommt er auch zum Wachstum und bildet tautropfenartige Kolonieen, die bei stärkerer Vergrößerung rund sind und glatte oder gekerbte Ränder haben, deren Mitte etwas erhaben ist. Die Kolonieen bleiben klein und werden später etwas weißlich. In gewöhnlicher oder traubenzuckerhaltiger Bouillon bildet sich ein krümeliger Niederschlag. In flüssigem Blutserum (Menschenblutserum) bildet sich ein flockiger Niederschlag; das Serum wird gelatinös und undurchsichtig. In Milch führt unser Leuconostoc Gerinnung herbei.

In alkalischer Gelatine ist bei 20° C fast gar keine Vegetation; erst nach längerer Zeit tritt der Impfstrich etwas hervor, aber nicht in der Weise, wie der Streptococcus pyogenes.

Auf Malzagar bildet Leuconostoc hominis runde, weißliche Kolonieen, in Malzbouillon einen krümligen oder flockigen Niederschlag.

In den neutralen oder alkalischen Nährböden nimmt der Leuconostoc hominis mehr die rundliche Form an und bildet Diplokokkenketten oder Ketten aus rundlichen, manchmal scheibenförmigen Gliedern, von denen manche bedeutendere Größe erreichen; die letzteren widerstehen aber nicht höheren Temperaturgraden. Manchmal findet man Ketten von großen rundlichen Gliedern, die sich energischer färben, als die übrigen. In älteren Kulturen auf alkalischen Nährböden oder in dem

hängenden Tropfen (Blutserum), auch im menschlichen Blutserum finden wir neben den runden Ketten, die manchmal wie in einer Scheide liegen, auch die bauchigen, ovoiden, länglich gestreckten oder lanzettförmigen Formen, wie in den sauren Nährböden. Der Leuconostoc färbt sich nach der Gram- und Weigert'schen Methode; seine Hülle färbt sich mit Karbolfuchsin; alkalische Farben lösen die Hülle teilweise auf. (Dextran löst sich in Alkalien auf.)

Aus dem Vorhergehenden ergiebt sich, daß der Leuconostoc hominis ein kettenbildendes Bakterium ist, welches auf nicht zuckerhaltigen Nährböden dem Streptococcus ähnliche Kettenbakterien bildet, die zumeist wohl als dem Streptococcus-Genus angehörig gedeutet wurden, die aber sich von diesem einerseits dadurch unterscheiden, daß sie zumeist als Diplokokken oder in Kettenreihen verbunden sind, die manchmal wie in einer Scheide liegen (Blutserum), andererseits, daß einige Kettenglieder eine mehr langgestreckte oder bauchige, lanzettförmige Form annehmen oder manchmal minuskule Geldrollenreihen bilden.

In saccharosehaltigen Nährböden ist die Diplokokkenbildung eine häufigere, neben kurzen Diplokokkenketten, die in einer Dextranhülle liegen; überdies kommen auch hier länglich gestreckte Formen vor neben bauchigen, wetzsteinartigen oder ovoiden, so daß man eher von kurzen Streptobacillen oder wenigstens von ovoiden Streptokokken reden könnte.

Die Aehnlichkeit des Leuconostoc hominis mit Leuconostoc mesenteroides, der durch Dextranbildung die Rübensäfte und Zuckersäfte in rascher Zeit vernichten kann, ist frappierend und in morphologischer Hinsicht nach meinen eigenen Erfahrungen, als auch im Hinblick auf Zopf's Arbeiten höchst wahrscheinlich. Immerhin kann ich mich in dieser Hinsicht nicht aussprechen, da ich keiner frischen Leuconostoc mesenteroides-Kultur, die uns vor Jahren auf Melasseagar leicht gelungen ist, habhaft werden konnte.

Im weiteren will ich nun über die Fundstätten des Leuconostoc hominis berichten.

I. Scarlatina. Zur Untersuchung kamen nachfolgende 21 Fälle:

1) Princ, Fr., 8 Jahre, 5. Oktober 1901. Exanthem, 2 Tage. — Untersucht wurde der Tonsillarbelag und Blut. Am 4. Tage des Exanthems finden sich im Blute Diplostreptokokken wie in einer Scheide eingebettet, die im Tonsillarbelage immer zu finden sind. Heilung.

2) Kautský, K., 4 Jahre. 8. Oktober 1901. 3 Tage altes Exanthem, Tonsillarnekrose. Im Blut Kettenkokken und Tonsillarbelag, hauptsächlich Diplostreptokokken. Tod 9. Oktober. Kulturen aus Herzblut, Lymphdrüsen, Milz, Harn und Tonsille ergaben auf den gewöhnlichen Nährböden Geldrollenketten, die bald eingingen. Die mikroskopische Untersuchung ergab: Tonsillen fast in der Gänze nekrotisch und in den tieferen Schichten nur von Kettenkokken durchsetzt, während in den oberflächlichen Schichten neben Vibrionen Leptothrix-Fäden und Kokkenhaufen sich finden. In den Lungen finden sich Kettenkokken und desgleichen in den Gefäßen der Milz, Niere, Leber. In der Leber sind überdies interacinös gelagerte kleinzellige Infiltrate ohne Mikroben.

3) Jeřábek Svatopluk, 13 Monate, 11. Oktober 1901. Exanthem, 1 Tag bestehend. Blut aus dem Lebenden mit negativem Erfolg untersucht; Tonsillarbelag enthält neben anderen Bakterien Diplostreptokokken. 14. Oktober Tod an beiderseitiger Pneumonie. Die Kulturen ergaben aus Herzblut, Milz, Lungen, Nieren, Harn und Tonsillarbelag Diplostreptokokken wie in einer Scheide eingebettet, und zwar auf den

gewöhnlichen Nährböden, die abermals rasch eingingen und nicht pathogen auf Menschen und Tiere wirkten. Die mikroskopische Untersuchung ergab: Tonsillen fast ganz nekrotisch, in den tiefen Partieen nur von Diplokokken und Diplostreptokokken durchsetzt; Kettenkokken in der Lunge, in den hepatisierten Alveolen liegend, des weiteren in den Gefäßen der Niere, Leber, Milz.

4 u. 5) Zwei Fälle von leichter Scarlatina. Pačes, M., 5 Jahre. Die Untersuchung des Blutes aus dem Lebenden negativ, des Tonsillarbelages ergiebt Diplokokken.

6) R. Fraut, 8 Jahre, 7. Dezember 1901. Exanthem, 4 Tage dauernd.

7) J., Marie, 7 Jahre. 7. Dezember 1902. Exanthem, 2 Tage dauernd.

In diesen beiden Fällen wurde der Tonsillarbelag auf die verschiedensten Nährböden verimpft und unter anderem auch auf die zuckerhaltigen Nährboden. In beiden Fällen wuchs in Kandisbouillon und Agar der dextranbildende Diplostreptococcus, der hier zum erstenmal als Leuconostoc erkannt wurde.

8) Cl. Jan, 11-jähriger Knabe. 9. Dezember 1901. Exanthem, 3 Tage dauernd. Untersucht wurde der Tonsillarbelag, es wuchs Leuconostoc mit Tafelkokken vergesellschaftet.

9) J., Marie, 10 Jahre. In Sopor eingebrachtes Mädchen, mit Exanthem, stirbt denselben Tag (16. Dezember 1901). Pathol.-anat. Diagnose: Tonsillitis necrotica. Intumescentia gland. lymphat. Scarlatina. (Exanthem an der frischen Leiche 2 Stunden p. m. noch zu sehen.) Kulturen aus Herzblut, Lymphdrüsen, Tonsillen auf zuckerhaltiger Bouillon und Agar ergiebt Leuconostoc.

10, 11 u. 12) H. Fr., H. Wenzel, Kirmon Marie, Kinder von 6, 7, 8 Jahren, werden am 19. Dezember mit Scarlatina auf die Abteilung (ebenso wie die Fälle 1—9) des Prof. Maixner, dem ich für das gütige Ueberlassen der Fälle danke, eingebracht. In allen drei Fällen läßt sich aus dem Tonsillarbelag der Leuconostoc reinzüchten.

13) R. Vlastimil, 5 Jahre, 17. Januar 1902. Exanthem 4 Tage dauernd, Tonsillenbelag und Blut entnommen von dem Lebenden direkt auf Platten (Zopf'scher Agar) verrieben. Leuconostoc aus Blut und Tonsille. Ebenso wächst aus dem Harn Leuconostoc.

14) C. Josefine, 20 Jahre, 29. Januar 1902. Exanthem 1 Tag dauernd. Aus Tonsillenbelag und Blut vom Lebenden genommen, wächst Leuconostoc.

15) J. N., 1. Februar 1902. Exanthem, 4 Tage. Aus Blut und Tonsillenbelag vom Lebenden Leuconostoc. Das Blut wurde dem sorgfältigst gereinigten Finger entnommen und reichliche Bluttropfen wurden auf die Platte direkt fallen gelassen.

16) Šm., Anna, 10 Jahre. 15. Februar 1902. Blut und Tonsillarbelag direkt auf Zopf's Bouillon und Zopf's Agarplatten geimpft. Es wächst Leuconostoc in beiden.

17) H., Anna, 13 Jahre, 24. Februar. Schwere Scarlatina aus der Privatpraxis Prof. Dr. Scherer's. Die Mutter des Kindes erkrankte mit Angina (gelblich-grüner Belag.) Aus dem Tonsillarbelag beider wächst Leuconostoc.

18) J. F., stud. phil., 22 Jahre, 1. März 1902. Exanthem, 4 Tage; Tonsillitis pseudomembranacea. Aus dem Tonsillarbelage Leuconostoc, aus dem Blut nichts.

19) J. B., 7 Jahre, Knabe, 6. März 1902. Exanthem, 3 Tage.

20) M. P., 20-jähriges Mädchen, 6. März 1902. Exanthem 4 Tage.

In beiden Fällen wuchs aus Blut und Tonsillarbelag, vom Lebenden genommen, Leuconostoc. (Die Fälle 13—16, 18—20 entstammen der Abteilung des Herren Hofrat Eiselt, für dessen Liebenswürdigkeit ich danke.)

21) J. B., 7 Jahre altes Mädchen, starb im Kinderspital am 14. März 1902, am 14. Tage nach dem Erscheinen des Exanthems. Die am 14. März erfolgte Obduktion ergab Nephritis dispersa haemorrhagica. Kulturen aus der Milz auf Zopf'scher Bouillon und Agar ergaben Leuconostoc, aus den Tonsillen, die keine Veränderungen zeigten, wuchs Saccharomyces und Leuconostoc.

Das Resultat der bakteriologischen Untersuchung ergiebt, daß bei Scharlach der Leuconostoc sich in dem Tonsillarbelag vorfindet und daß derselbe 6mal auch im Blute (vom Lebenden) nachgewiesen werden konnte; einmal im Harn. Aus dem Leichenmaterial (2 Fälle) wuchs Leuconostoc nicht nur aus Tonsillenbelag, sondern auch aus Herzblut, Milz, Lymphdrüsen. Demnach ist der von Anderen und mir so oft konstatierte Diplococcus oder Streptococcus scarlatinae eine eigene Species, die dem Genus Leuconostoc zuzuzählen ist. Mikroskopisch sieht man in den Tonsillarnekrosen, in der Milz und den Nieren Diplostreptokokken, allerdings ohne Hüllenbildung. Auffällig ist das häufige Vorkommen des Leuconostoc im Blute bei Scharlachfällen, die nicht besonders schwer sind. Der Leuconostoc spielt entschieden eine wichtige Rolle in der Pathogenese der Scarlatina.

II. Morbilli. Zum Vergleich untersuchte ich 8 Fälle von Masern (I. 21. Dezember 1901 ein 4-jähriger Knabe, II. 18. Januar 1902 ein 25-jähriger Mann, III. 25. Januar 1901 ein 20-jähriges Mädchen, IV. 15. Februar 1902 das 4-jährige Mädchen meines Assistenten, V. 18. Februar 1902 ein 10-jähriges Mädchen, VI. 20-jähriger stud. phil. 19. Februar 1902, VII. ein 9-jähriges Mädchen, 14. März 1902, VIII. 21. März ein 8-jähriges Mädchen.) Alle entstammen der Infektionsabteilung des Herrn Hofrat Prof. Eiselt und erkrankten mit Conjunctivitis, Rhinitis und charakteristischem Exanthem. In diesen Fällen kamen zur Untersuchung (vom Lebenden) Blut, Tonsillenbelag, enventuell Nasensekret und Sputum. In allen Fällen wuchs aus Tonsillenbelag, Nasensekret und Sputum unser Leuconostoc und zweimal konnten wir ihn aus dem reichlichst genommenen Blute kultivieren. Mikroskopisch finden wir in den Lungen bei der spezifischen morbillösen Pneumonie auch Diplo- und Diplostreptokokken, ähnlich in der Milz und Nieren. Der Kettencoccus, der sich bei Morbillen im Nasensekret, Sputum, Tonsillarbelag und im Blute findet, ist demnach auch ein Leuconostoc.

III. Diphtheria. Ich hatte Gelegenheit, nur einen Fall zu untersuchen, und fand, daß der neben Diphtheriebacillen sich vorfindende Kettencoccus auch dem Genus Leuconostoc angehört.

IV. Angina. Der Eiter phlegmonöser Angina enthält Diplostreptokokken, die auf Saccharoseagar ebenfalls Dextranhüllen bilden. Ebenso finden wir den Leuconostoc bei lakunären Anginen.

V. Bei übertragbarer Coryza finden sich im Nasensekret mikroskopisch in überwiegender Menge Diplostreptokokken, die sich auch als Leuconostoc ergeben (Niesen auf die Saccharoseagarplatte).

VI. Mundhöhle. Untersucht man den Zahnbelag oder cariöse Zähne, so finden wir auch Diplostreptokokken und diese wachsen in Zopfscher Bouillon als Leuconostoc-Formen. Auch aus Sputum oder von der Oberfläche anscheinend gesunder Tonsillen läßt sich der Leuconostoc kultivieren. Untersucht man Tonsillen und Lacunarinhalt bei Leichen, so findet man in vielen Fällen Leuconostoc. Bei jungen Kindern, bei alten Leuten mit atrophischer Tonsille fand ich den Leuconostoc nicht. Es ergiebt sich, daß der Leuconostoc ein Bewohner der Mundhöhle ist, wo er durch seine Säureproduktion bei der Zersetzung von Zucker wohl pathogen wirken kann.

VII. Bei der Untersuchung des Magendarmkanalinhaltes konstatierte ich den Leuconostoc bei einem Falle von Dysenterie (Pseudodysenteria nach Kruse) aus der Irrenanstalt in den Faeces und einmal bei Appendicitis purulenta.

VIII. Flecktyphus. Es sei mir gestattet, an dieser Stelle zu erwähnen, daß der Streptobacillus, den ich bei Typhus exanthematicus gefunden habe (l. c. 1 d.) wohl identisch ist mit dem Leuconostoc. Es geht dieses hervor einerseits aus meinen Präparaten, andererseits stimmt die Beschreibung des kulturellen Verhaltens dieses Streptobacillus auf den alkalischen Nährboden mit meinen jetzigen Befunden überein. Nicht passend war die von mir gewählte Benennung Streptobacillus, da sie nicht die richtige Vorstellung von der Form der bei Typhus exanthematicus gefundenen Bakterien gab. Aus den Abbildungen, die ich in meiner Arbeit anführe, ersieht man, daß die Kettenbakterien bei Typhus exanthematicus aus runden, ovoiden und manchmal länger gestreckten Gliedern bestehen, die einzeln oder zu zweien aneinandergereiht sind. Ich erwähnte (l. c. p. 142) auch die große Aehnlichkeit meines Streptobacillus mit dem Streptococcus pyogenes und glaubte berechtigt zu sein, als Hauptunterschied zwischen diesen Formen anzuführen einmal den Uebergang der rundlichen oder ovoiden Glieder in die langgestreckte (bacillenartige Form), andererseits seine Unkultivierbarkeit in alkalischer Gelatine. Das war der Grund, weshalb ich diese Kettenbakterien als Streptobacillen bezeichnete. [Ich bemerke nebenbei[1]), daß in Typhus exanthematicus-Leichen neben dem Leuconostoc (Streptobacillus) sich verschiedene Mikroorganismeneinwanderungen konstatieren lassen. So fand ich in drei zeitlich verschiedenen Epidemieen in einigen Fällen den Streptococcus pyogenes, in anderen den Staphylococcus pyogenes aureus (posttyphöse Phlegmonen), in anderen einen Vibrio (ruber) oder das Bacterium septatum; in der letzten Epidemie aus dem Jahre 1899 fand ich neben Bakterien in Herzblut und Milz mikroskopisch und bakteriologisch Saccharomycetenformen, die in den Kulturen wie Monilia candida wuchsen, was mich verleitete, bei T. e. an eine Hyphomykose zu glauben, wie dies auch Calmette und Thoinot supponieren. Neuere Untersuchungen werden wohl Klarheit in diese Angaben bringen und zeigen, daß es sich wohl zumeist um Sekundärinvasionen handelt, von welchen die Leuconostoc- resp. Streptobacilleninvasion oder Saccharomyces-Invasion die häufigste ist[2]). Auch bei Flecktyphus finden wir im Initialstadium eine Angina, die in manchen Fällen als pseudomembranosa sich manifestiert.

---

1) Vide meine weiteren Publikationen über Typhus exanthematicus: Rozpravy české Akademie (Berichte der böhmischen Akademie 1893 und 1899.)

2) Mein Assistent Dr. Honl fand einmal bei Typhus abdominalis auch eine sekundäre Saccharomycosis in der Milz (Saccharomyces albicans).

IX. Tierexperimente (Mäuse, Ratten, Meerschweinchen, Katzen, Hunde, Schweine). Die intravenöse Injektion von Leuconostoc hominis (von Scharlach, Morbillen stammend, der auf stark zuckerhaltigen Nährböden gezüchtet ist) ist negativ. Subkutane Injektionen führen manchmal nur zu Abscessen bei Mäusen. Der nackte Leuconostoc, auf Maltose, neutralen oder leicht alkalischen Nährböden gezüchtet, ist zumeist inaktiv; nur die Kulturen des Leuconostoc (Scharlach, Morbilli) in flüssigem menschlichen Blutserum sind auch für schwächere Kaninchen pathogen bei intravenöser Einführung. Diese gehen in 3—9 Tagen zu Grunde (Bakteriämie ohne lokale Affekte.) Bei Schweinen ist der Leuconostoc (aus Scharlach, Morbilli) nicht besonders wirksam. Eine 24 Stunden andauernde Temperaturerhöhung ist das einzige, was wir beobachtet haben. Bei dem einen Schwein sahen wir einige rote Flecke auf der Haut, aber schon nach 24 Stunden, sich entwickeln, bei dem anderen aber nicht. Es läßt sich aus diesen letzteren Experimenten wohl nichts Sicheres ableiten.

Durch diese geringe pathogene Wirkung des Leuconostoc auf Tiere bleibt die Frage der Immunisierung und eventuellen therapeutischen Verwendung eines Serums, insbesondere gegen schwere Diphtherie, Scharlach, Masern und Flecktyphus, gegen welche Marmorek's Streptokokkenserum unwirksam bleibt, eine schwer lösbare. Doch läßt sich erhoffen, daß auch sie gelöst wird. Ich behalte mir vor, über weitere Tierversuche, die im Gange sind, zu berichten, wenn sie ein positives Resultat liefern werden.

Ueberblicken wir die Fundstätten des Leuconostoc hominis, so sehen wir zunächst, daß er in der Mundhöhle seinen Sitz hat. Sodann finden wir den Leuconostoc in den verschiedenen Affektionen der Mundhöhle, als Angina phlegmonosa, diphtherica, scarlatinosa, morbillosa (typhi exanthematici) und in den von diesen Affektionen ausgehenden Krankheiten der Nachbarorgane oder des ganzen Körpers. Demnach finden wir ihn bei Rhinitis morbillosa, diphtherica und im Blute bei Scharlach, Masern, Flecktyphus. Schließlich findet er sich bei infektiöser Coryza, bei Caries der Zähne und im Darmtrakt der endemischen Anstaltsdysenterie.

Das Auftreten des Leuconostoc einerseits bei Scharlachtonsillarnekrose, andererseits im Blute von Scharlachkranken, als auch bei Masern (Tonsillen, Blut, Sputum, Nasensekret, Lunge) und Flecktyphus (Blut, wahrscheinlich Tonsillen) zeigt, daß ihm eine wesentliche Rolle bei den akuten Exanthemen zufällt, daß er ebenso pathogen werden kann, wie der Pneumobacillus und der Diphtheriebacillus, oder daß der Leuconostoc scarlatinae, morbilli, typhi exanthematici eine pathogene Abart des Leuconostoc hominis ist, wie etwa der Bacillus diphtheriae des Bact. septatum.

Ob der Leuconostoc spezifisch für die einzelnen exanthematischen Krankheiten ist, läßt sich vorläufig durch Experimente nicht nachweisen, und sind weitere Untersuchungen mit reichlicherem Material, als mir zu Gebote steht, darüber anzustellen, die auch eventuell Unterschiede zwischen diesen Leuconostoc-Arten statuieren müßten.

Der Leuconostoc ist nicht identisch mit dem Streptococcus pyogenes, da mehrere Stämme aus Phlegmonen, Sepsis, Erysipelas auf Saccharoseagar durchaus keine Hüllen bilden und da auch die Diplokokkenform als eine mehr dem Leuconostoc angehörige anzusehen ist.

Erwiderung auf die Mitteilung von Herrn Dr. Thalmann „Zur Biologie der Gonokokken“.

Von Dr. **Wildbolz** in Bern.

In einer in No. 14. Bd. XXXI dieser Zeitschrift erschienenen Mitteilung „Zur Biologie der Gonokokken“ äußert sich Herr Dr. Thalmann bei Erwähnung meiner unter demselben Titel im Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. XXXI. 1902. No. 4 veröffentlichten Mitteilung, daß mir beim Schreiben derselben seine früher mitgeteilte Züchtungsmethode der Gonokokken offenbar nicht bekannt gewesen sei. Da diese Annahme Thalmann's nicht zutreffend ist, mir vielmehr seine äußerst interessante Arbeit wohl bekannt war, sehe ich mich veranlaßt, hier kurz auseinanderzusetzen, weshalb ich in meiner knapp gefaßten Publikation des Thalmann'schen Nährbodens nicht gedachte:

Es war mir bei dieser von Thalmann citierten Mitteilung lediglich um den Hinweis zu thun, daß entgegen der stets noch vorherrschenden Ansicht die Gonokokken auch auf den gewöhnlichen, allgemein zur Bakterienzüchtung verwendeten Agar- und Bouillonnährböden ein recht gutes, viele Generationen hindurch anhaltendes Wachstum zeigen können, daß also das Wachstum eines Gram-negativen Diplococcus auf den gewöhnlichen Nährböden die Diagnose Gonococcus keineswegs ausschließt. Zu diesem Zwecke war es natürlich notwendig, bei meinen Versuchen, entsprechend der allgemein giltigen Vorschrift, Nährböden zu verwenden, deren Reaktion, mit Lackmus bestimmt, leicht alkalisch war. Ich ließ also die Thalmann'schen Vorschriften nicht, wie Thalmann glaubt, aus Unkenntnis der Wichtigkeit der Reaktion außer acht, sondern absichtlich.

Ueber das Wachstum der Gonokokken auf serumfreien Nährböden überhaupt behielt ich mir ausführlichere Mitteilungen für eine demnächst erscheinende Publikation vor. Den Thalmann'schen Nährboden, dessen Darstellung von der der allgemein üblichen Nährböden erheblich abweicht, erwähnte ich vorläufig ebensowenig wie die serumfreien Gonokokkennährböden von Finger, Patellani u. A., weil dem Wachstum der Gonokokken auf diesen Nährböden ja nie eine differentialdiagnostische Bedeutung beigemessen wurde.

Schließlich möchte ich noch darauf hinweisen, daß das Wachstum der Gonokokken auf den gewöhnlichen, allgemein üblichen Nährböden, wie es in letzter Zeit wieder von Nicolaysen, Urbahn und mir beobachtet wurde, wesentlich anders verläuft als auf dem Thalmannschen Nährmedium. Auf ersteren ist meist die Aufzucht der Gonokokken schwierig, die Weiterzucht aber relativ leicht, auf dem Thalmann'schen Nährboden dagegen gelingt nur die Aufzucht der 1. Generation mit Leichtigkeit, eine Weiterzüchtung aber nur in so beschränktem Maße, daß Thalmann selbst seine serumfreien Nährböden zur Weiterzüchtung nicht empfiehlt.

Bern, 28. Juni 1902.

Diplococcus im Sputum als Antagonist der pyogenen Staphylo- und Streptokokken.

[Aus dem bakteriologischen Laboratorium des Militärhospitals in Kiew.]

Von Dr. med. **D. Gromakowsky.**

Bei bakteriologischen Untersuchungen von Sputum verschiedener Kranker habe ich nicht selten folgende Thatsachen beobachtet:

Wenn man aus frisch gesammeltem Sputum (Tuberkulöser oder an chronischer Bronchitis Leidender) eine Strichkultur auf schief erstarrtem Agar macht, so entwickeln sich bei einer Temperatur von 37° C vorzugsweise Kolonieen der Staphylokokken, wenn man dagegen denselben Auswurf in einem Reagenzgläschen mit Bouillon umschüttelt, dann auf einen Tag im Thermostaten unterbringt und darauf auf einer schiefen Agarfläche einen Strich von trübe gewordener Bouillon macht (der Auswurf setzt sich auf dem Boden des Reagenzgläschens ab), so kann man beobachten, daß nach Verlauf von 24 Stunden längs dem gemachten Striche sich verhältnismäßig nur sehr kleine Kolonieen bilden, große Kolonieen der Staphylokokken sich dagegen gar nicht entwickeln, oder nur einzeln vorkommen.

Diese eben angeführte Thatsache der Lebensunfähigkeit oder das Verschwinden der Staphylokokken im Sputum hängt, wie es scheint, von der Gegenwart eines den Eitermikroben antagonistischen Mikroorganismus ab.

Wie schon erwähnt, zeigt die Strichkultur auf schiefem Agar aus einem 24 Stunden im Brutschrank gestandenen Gemisch von Bouillon mit Sputum vorherrschend nur sehr kleine Kolonieen, die in zwei Gruppen zerfallen.

Die eine erinnert an Kolonieen von Pneumokokken, die andere, kleinere, an Punktkolonieen. Diese kleinsten grauen Kolonieen, die man nur mit Hilfe der Lupe verpflanzen kann, sind eben die Antagonisten der Eitermikroben.

Unter dem Mikroskop erinnern diese Mikroorganismen stark an Pneumokokken und auch an Streptokokken; sie bilden teilweise kurze Kettenreihen, teilweise ovalgestaltete Diplokokken; sie unterscheiden sich von den genannten Mikroorganismen anscheinend nur durch die Größe; sie sind ein wenig kleiner und nehmen die Färbung nach Gram an.

Auf Agar bilden sie punktförmige Kolonieen, die kleiner als die der Pneumokokken und Streptokokken sind, und wachsen nicht auf Gelatine.

Bouillon wird ein wenig getrübt, auf dem Boden des Reagenzgläschens bildet sich ein feiner, sandähnlicher, recht spärlicher Niederschlag. Die Reaktion der Bouillon bleibt unverändert.

Injektion der Bouillonkultur in die Ohrenhaut des Kaninchens gab negative Resultate, ebenso die subkutanen wie auch direkten Einspritzungen in das Blut und Peritoneum.

Wenn man zu 5 ccm einer 2-tägigen Bouillonkultur der Diplokokken 2 Tropfen einer eintägigen Bouillonkultur der Staphylokokken zusetzt (diese Versuche sind mit 8 Kulturen der Staphylokokken, vorzugsweise des Staphylococcus aureus aus dem Sputum bei chronischer Er-

krankung der Lungen und Bronchien unternommen; die Bouillonkultur dieser Staphylokokken verursacht bei Kaninchen bei subkutaner Injektion Abscesse), darauf in den Brutschrank stellt und dann nach bestimmten Zeitunterbrechungen Aussaaten auf Agar macht, so überzeugt man sich, daß nach 24 Stunden die Kolonieen der Staphylokokken nicht mehr vorhanden sind.

Wenn die Quantität der zugesetzten Staphylokokkenkultur mehr als 2 Tröpfchen beträgt, so sind die Resultate unbeständig. In einem Falle hatten wir eine Kultur von Diplokokken, in welcher die Staphylokokken, in einem Drittel des vorhandenen Quantums zugesetzt, in 24 Stunden umkommen; im anderen Falle entwickelten sich die Staphylokokken schon bei Zusatz von 4 Tropfen der erwähnten Kultur.

Etwas anders waren die Resultate dort, wo zur Kultur der Diplokokken eine Bouillonkultur des Staphylococcus aureus aus dem Eiter von Abscessen zugesetzt wurde. Von 5 solchen Kulturen kam im Verlauf von 24 Stunden nur eine um; dieselbe war im Quantum von 3 Tropfen zu 5 ccm reiner Bouillonkultur des Diplococcus zugesetzt. Bei einer Reihe von Versuchen, in welchen die Kultur des Staphylococcus durch eine Kultur von Streptococcus aus Abscessen ersetzt wurde, erhielt man positive Resultate, d. h. eintägige Bouillonkultur des Streptococcus zugesetzt im Quantum eines Tropfens zur Bouillonkultur des Diplococcus, gab nicht nur Wachstum, sondern kam im Verlaufe von 24 Stunden um, was bei Kontrollversuchen auf dem Agar sich bestätigte. Der Versuch wurde mit fünf Kulturen des Streptococcus, die bei 5 Kranken aus Abscessen genommen waren, angestellt.

In den Versuchen, wo die Kultur des Diplococcus durch Kulturen des Streptococcus aus Sputum bei akuter Bronchitis, Streptokokken aus Abscessen und Pneumokokken ersetzt wurde, erhielt man negative Resultate. Die Staphylokokken kamen unter denselben Bedingungen nicht in der Bouillonkultur der Streptokokken und Pneumokokken um. Die eben erwähnten Versuche beweisen, daß der beschriebene Diplococcus nicht mit den Strepto- und Pneumokokken identisch ist.

Der Diplococcus, mit dem die Versuche angestellt wurden, war in reiner Kultur aus dem Sputum von 8 Kranken entnommen: fünf Lungentuberkulöse und drei mit chronischer Bronchitis.

Wenn wir alle Resultate der Versuche zusammenfassen, können wir zu folgendem Schlusse kommen: Bei einigen Erkrankungen (tuberkulöse und chronische Bronchitis) trifft man im Sputum Mikroorganismen, die unter dem Mikroskop und in Kulturen sehr an Streptokokken und Pneumokokken erinnern; die Bouillonkultur dieses Mikroorganismus wirkt bakterientötend auf den Staphylococcus pyogenes aus dem Sputum chronisch erkrankter Lungen und Bronchien und ebenso auf den Streptococcus pyogenes aus Abscessen.

Die bakterientötende Wirkung der Kultur der Diplokokken auf den Staphylococcus und Streptococcus äußert sich nur dann, wenn ein bestimmtes Mengenverhältnis derselben vorhanden ist.

Nachdruck verboten.

Ueber die Lebensbedingungen des Tuberkuloseerregers in der Salzbutter.

[Aus dem pathologischen Institute der Universität Upsala.]

Von Dr. med. **Alfred Pettersson,**
stellvertretendem Prosektor am pathologischen Institute.

Durch zahlreiche Untersuchungen ist festgestellt worden, daß Tuberkelbacillen ziemlich oft in der Marktbutter vorkommen. Die Ergebnisse der verschiedenen Untersuchungen sind aber sehr wenig übereinstimmend. Einige haben einen ganz negativen Befund verzeichnet, während Andere sämtliche untersuchte Proben mit Tuberkelbacillen infiziert fanden.

Von den mit 42 Butterproben infizierten Tieren fand Schuchardt[1]) nur eins, das tuberkulöse Veränderungen aufwies. Das Krankheitsbild entsprach aber gar nicht dem der peritonealen Impftuberkulose. Auch wenn es sich um echte Tuberkulose handelte, dürfte diese nicht aus der Butter gekommen sein.

Rabinowitsch[2]) untersuchte 1897 30 Proben in Berlin und 50 in Philadelphia, ohne ein einziges Mal Tuberkelbacillen nachweisen zu können. Dagegen fand Petri[3]), der auch Berliner Butter untersuchte, von 102 Proben 33, d. h. 32,3 Proz., mit Tuberkelbacillen infiziert. Hormann und Morgenroth[4]) erhielten unter 10 Proben, die jedoch aus nur drei Bezugsquellen stammten, 3 mit Tuberkelbacillen. Rabinowitsch[5]) nahm 1898 die Butteruntersuchungen auf Tuberkelbacillen von neuem auf. Die erste Reihe umfaßte 15 Butterproben aus 14 Geschäften. Nur 2, die aus demselben Geschäfte waren, enthielten lebende, virulente Tuberkelbacillen. In der 2. und 3. Reihe wurden zu verschiedenen Zeiten mehrere Proben aus demselben Geschäfte untersucht. Das Resultat dieser Untersuchungen war, daß in 87,5 bezw. 100 Proz. der Proben Tuberkelbacillen nachgewiesen wurden. Dagegen war die Butter eines zweiten Geschäftes, die als Kontrolle benutzt wurde, ebenso wie 19 andere Butterproben verschiedentlichster Herkunft, immer frei von virulenten Tuberkelbacillen.

Von 10 untersuchten Proben gesalzener Butter, die aus einer Quelle stammten, gelang es Obermüller[6]) bei 4, 40 Proz., den positiven Nachweis vom Vorhandensein echter Tuberkelbacillen zu erbringen.

Herbert[7]) gelang es, in 126 Butterproben, von denen 100 auf Württemberg, die übrigen auf Berlin und München entfielen, nicht ein einziges Mal echte Tuberkelbacillen nachzuweisen.

Korn[8]) fand in 17 Proben ungesalzener Freiburger Butter, zum

---

1) Schuchardt, Diss. Marburg 1896.
2) Rabinowitsch, Zeitschr. f. Hyg. Bd. XXVI. 1897.
3) Petri, Arbeiten a. d. kais. Gesundheitsamte. Bd. XIV. 1898.
4) Hormann und Morgenroth, Hyg. Rundschau. 1897.
5) Rabinowitsch, Deutsche med. Wochenschr. 1899.
6) Obermüller, Hyg. Rundschau. Bd. IX. 1899.
7) Herbert, Arb. a. d. Geb. der path. Anatomie von Baumgarten. Bd. III. Heft 1.
8) Korn, Arch. f. Hyg. Bd. XXXVI.

Teil aus saurem Rahm, 4mal, 23,5 Proz., Tuberkelbacillen. Die Butter war größtenteils von den Bäuerinnen direkt gekauft.

Coggi[1]) untersuchte 100 Proben Marktbutter in Mailand. Nur 2 von ihnen riefen bei den Versuchstieren Tuberkulose hervor.

Ascher[2]) wies unter 27 Butterproben von 22 Entnahmestellen, unter denen sich Meiereien kleinsten, mittleren und großen Umfanges befanden, 2 nach, 7,3 Proz., die Tuberkelbacillen enthielten. Weissenfeld[3]) untersuchte 32 Proben, die entweder in der Umgegend von Bonn auf dem Lande produziert waren oder aus Meiereien des Rheinlandes, Westfalen und Holland stammten. Drei der Proben, 9,36 Proz., machten die Versuchstiere tuberkulös. Zwei der betreffenden Meiereien pasteurisierten ihre Produkte.

Die von Schuchardt schon vorher untersuchte Marburger Butter unterzog Abenhausen[4]) einer neuen Untersuchung mit demselben Resultate. Von 25 Proben rief keine Tuberkulose der Versuchstiere hervor.

Hellström[5]) untersuchte in Helsingfors 12 Proben Salzbutter. Nur eine verursachte Tuberkulose. Von den Proben sind, betreffs Vorkommnis des Tuberkelbacillus, 7 auszuschließen. Drei waren aus pasteurisiertem Rahm hergestellt und 4 riefen bei den Versuchstieren akute, tödliche Krankheiten hervor.

Tobler[6]) untersuchte 12 Butterproben aus Läden und Molkereien der Stadt Zürich. Zwei der Proben stammten aus demselben Geschäfte. Nur zwei verursachten bei je einem Versuchstiere echte Tuberkulose.

Herr und Beninde[7]) untersuchten 52 Butterproben aus 45 Produktionsstellen und es gelang ihnen, in 5 derselben, gleich 11,1 Proz., Tuberkelbacillen nachzuweisen.

Unter 43 Proben von Wiener Marktbutter fand Markl[8]) keine, die Tuberkelbacillen enthielt. Von den Tieren starben 10 innerhalb der ersten Woche. Wie viele Proben dadurch auszuschließen waren, ist aus dem Aufsatz nicht ersichtlich.

In Budapester Butter fand Aujeszky[9]) von 17 Butterproben 3, gleich 17 Proz., mit Tuberkelbacillen infiziert.

Bei dieser Zusammenstellung habe ich von den Untersuchungen mit positivem Befunde, welche vor der Entdeckung der tuberkelbacillenähnlichen Organismen durch Petri und Rabinowitsch angestellt wurden, wie die von Brucaferro, Roth, Gröning und die erste von Obermüller, ganz abgesehen.

Stellen wir die Prozentzahlen der Untersuchungen, die Proben aus mehreren Bezugsquellen umfassen, zusammen, so fanden:

Schuchardt	unter	42	Proben	bezw.	Bezugsquellen	0,0	Proz.	tuberkulöse
Rabinowitsch	"	80	"	"	"	0,0	"	"
"	"	14	"	"	"	7,1	"	"
"	"	19	"	"	"	0,0	"	"
Petri	"	102	"	"	"	32,3	"	"

1) Coggi, Giornali della reale societa italiana. (Ref. Centralbl. f. Bakt. etc. Bd. XXVII.)
2) Ascher, Zeitschr. f. Hyg. Bd. XXXII. 1899.
3) Weissenfeld, Berl. klin. Wochenschr. 1899.
4) Abenhausen, Diss. Marburg, 1900.
5) Hellström, Centralbl. f. Bakt. etc. Bd. XXVIII. 1900.
6) Tobler, Zeitschr. f. Hyg. Bd. XXXVI. 1901.
7) Herr und Beninde, Zeitschr. f. Hyg. Bd. XXXVIII. 1901.
8) Markl, Wiener klin. Wochenschr. 1901.
9) Aujeszky, Centralbl. f. Bakt. etc. I. Abt. Bd. XXXI.

Herbert	unter 126 Proben bezw. Bezugsquellen	0,0	Proz.	tuberkulöse
Korn	„ 17 „ „ „	23,5	„	„
Coggi	„ 100 „ „ „	2,0	„	„
Ascher	„ 22 „ „ „	9,0	„	„
Weissenfeld	„ 32 „ „ „	9,4	„	„
Hellström	„ 5 „ „ „	20,0	„	„
Tobler	„ 11 „ „ „	18,1	„	„
Herr und Beninde	„ 45 „ „ „	11,1	„	„
Markl	„ 43 „ „ „	0,0	„	„
Aujeszky	„ 17 „ „ „	17,0	„	„

Daß die Ergebnisse der verschiedenen Untersuchungen so wenig übereinstimmen, kann auf mehrere Ursachen zurückgeführt werden. Erstens ist die Rindertuberkulose nicht überall gleichmäßig verteilt. In Deutschland, wo die meisten Untersuchungen gemacht wurden, waren von den 1898 geschlachteten Rindern in Preußen 16,09 Proz., in Sachsen 30,46, in Bayern aber nur 5,7 Proz. tuberkulös[1]). In Baden sollen die Verhältnisse noch günstiger sein, nur 3,56 Proz. Rindertuberkulose[2]). In Preußen schwankte die Prozentzahl der verschiedenen Regierungsbezirke zwischen 30,69 und 5,94. In den mehr verseuchten Gegenden haben aber mehrere Meiereibesitzer keine Kosten gescheut, um die Tuberkulose aus dem Viehbestande auszurotten. Wird dann nicht genügend Rücksicht darauf genommen, daß die Proben wirklich von verschiedenen Produktionsstellen stammen, kann es leicht eintreffen, daß Butter derselben Sorte mehrmals als verschiedene Proben, besonders wenn sie in verschiedenen Geschäften gekauft worden ist, untersucht und das Resultat entstellt wird. Nach Herr und Beninde beherrschte die tuberkelbacillenhaltige Butter einiger Produktionsstellen samt und sonders den Breslauer Markt. Unter Butterproben von 22 Entnahmestellen fand Ascher nur in zweien Tuberkelbacillen. Die eine stammte aus einer großen Meierei, welche ihre Butter ausschließlich nach Berlin schickte.

Auch andere Umstände können die Ergebnisse der Untersuchung verwirren. Da der Tuberkuloseerreger ein Lebewesen ist, muß die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, daß die Bedingungen für das Erhalten des Lebens in der Butter vielleicht sehr ungünstig sein können. Es ließe sich denken, daß während der Zeit, die zwischen Herstellung und Untersuchung der Butter verstrichen ist, die in derselben anfangs befindlichen Keime sogar untergegangen sind.

Einige Untersuchungen betreffs dieser Frage sind schon angestellt worden. Heim[3]) vermischte eine schwach sauere Butter mit einer großen Menge (p. 295) Tuberkelbacillen und fand, daß sie noch nach 4 Wochen Meerschweinchen infizierten.

Gasperini[4]) mengte reiner Milch Kulturen von Tuberkelbacillen und käsigem Eiter bei und bereitete aus dieser Milch Butter. Er fand die Tuberkelbacillen virulent noch nach 120 Tagen; schon nach 30 Tagen aber fing die Virulenz an schwächer zu werden. In gut konservierter Butter würde sie sich länger erhalten.

Laser[5]) wiederholte 1891 diese Untersuchung. Er mischte eine 3 Tage alte gesalzene Butter mit einer Aufschwemmung von Tuberkel-

1) Siehe Baumgarten's Jahresbericht. 1899.
2) Nach Herr und Beninde, a. a. O. p. 167.
3) Heim, Arbeiten a. d. kaiserl. Gesundheitsamte. Bd. V. 1889.
4) Gasperini, Giornale della Reale Società ital. d'Igiene. 1890. (Nach Rabinowitsch.)
5) Laser, H., Zeitschr. f. Hyg. Bd. X. 1891.

bacillen und konnte dabei im Gegensatz zu Heim und Gasperini feststellen, daß bereits nach 6 Tagen die Tuberkelbacillen an Zahl (!) vermindert waren, daß es aber erst nach 12 Tagen keine infektionsfähigen Tuberkelbacillen mehr in der Butter gab. Eine exakte Angabe über die Menge der zugesetzten Bakterien und das Alter der Kulturen fehlt.

Nach Dawson[1]) sollen dagegen die Tuberkelbacillen erst nach ca. 3 Monaten abgeschwächt werden. Aber auch ein mit 8 Monate alter Butter geimpftes Meerschweinchen erwies sich bei der Sektion tuberkulös, obwohl es gesund zu sein schien.

Von den ungünstig wirkenden Momenten ist in erster Reihe der Salzgehalt der Butter zu berücksichtigen. Es kann vielleicht scheinen, als ob dieser keinen größeren Einfluß haben könne. Der Prozentgehalt von Salz auf die ganze Menge Butter berechnet, ist nicht sehr groß. Er überschreitet wohl selten 6 Proz. Wenn man aber bedenkt, daß das Salz in der ziemlich kleinen Menge Wasser, das die Butter enthält, gelöst ist, stellt sich die Sache ganz anders. Die Butter enthält also das Salz als eine ziemlich konzentrierte Lösung, die Lake. Daß diese auf die Bakterien schädlich einwirkt, ist wohl ohne weiteres einleuchtend. Es ist nicht sehr wahrscheinlich, daß ein größerer Teil von den in der Butter eingeschlossenen Bakterien von der Berührung mit dieser Salzflüssigkeit geschützt ist. Der Salzgehalt der Lake verschiedener Butterproben steht selbstverständlich in Beziehung sowohl zu dem Gehalt der Butter an Salz als an Wasser und muß deshalb bedeutend schwanken. Als Beispiel seien 2 Proben bester Meiereibutter angeführt. Sie stammten aus verschiedenen Produktionsstellen, beiden waren bei der Bereitung 4 Proz. Kochsalz zugesetzt. Die Salzmenge der fertigen Butter war aber sicherlich niedriger. Der Salzgehalt der Lake war 15,8 Proz. bezw. 17,6 Proz. Es ist mit keiner Schwierigkeit verbunden, die Konzentration dieser Salzlösung zu bestimmen. Ist man nicht in der Lage, eine Probe der Lake bei der Butterbereitung erhalten zu können, so kann durch Bearbeiten der Butter in einem Mörser die zum Titrieren nötige Menge ausgepreßt werden.

Ferner kommt die sauere Reaktion der Butter in Betracht. Auch kleine Mengen Säure sind im allgemeinen den Bakterien schädlich, besonders wenn sie sich in auch in anderen Beziehungen ungeeigneten Nährböden befinden. Schmidt[2]) hat auch durch genaue Versuche festgestellt, daß die sauere Beschaffenheit der Butter dieselbe zum Nährboden ungeeignet macht; die Keime sterben nach und nach ab. Wird die Butter aus ganz frischem, z. B. durch sogenanntes Separieren gewonnenem Rahm hergestellt, soll sie eigentlich neutral reagieren. Bei den Proben von solcher Süßrahmbutter, die ich bekommen habe, welche stets denselben Tag bereitet waren, habe ich nie eine unzweideutige sauere Reaktion gefunden. Die sauere Reaktion der unter sonst gleichen Verhältnissen aus angesäuertem Rahm hergestellten Butter wäre deshalb anfangs hauptsächlich auf Milchsäure zurückzuführen. Beim Aufbewahren steigt die Acidität der Butter. Nach Schmidt[1]) sollen im Anfang die Nichtfettbestandteile der Butter das Material für die Säurebildung abgeben, erst später tritt die Zersetzung des Butterfettes selbst mehr in die Erscheinung. Betreffs der Einwirkung auf

---

1) Dawson, Fifteenth annual report of the Bureau of animal industry 1898. U. S. Dept. of agricult. Washington 1899. (Ref. Hyg. Rundsch. 1900.)

2) Schmidt, Zeitschr. f. Hyg. Bd. XXVIII. 1898.

Bakterien kommen von den in der Butter entstandenen Säuren wohl nur die wasserlöslichen in Betracht. Es könnte deshalb von Interesse sein, den Säuregehalt dieser Lösung zu wissen. Bei einem Versuche mit Lake aus Ultunaer Butter genügten 10,6 ccm $\frac{N}{10}$ Alk., um 50 ccm der Flüssigkeit zu neutralisieren. Als Milchsäure berechnet, würde der Prozentgehalt 0,19 werden. Durch Waschen beim Bereiten dürfte die Acidität der frischen Butter herabgesetzt werden können.

Die oben angeführten Umstände sind von den meisten Untersuchern öfters nicht berücksichtigt worden. Nur selten ist das Alter der Probe angegeben, ebensowenig ob es sich um sauere oder Süßrahmbutter, Salz- oder Nichtsalzbutter handelte. Auch sollte die Temperatur, bei welcher die Butter aufbewahrt worden ist, angegeben sein.

In den oben angeführten experimentellen Untersuchungen über die Lebensdauer der Tuberkelbacillen in der Butter sind die Anforderungen an die Untersuchungen nicht genügend erfüllt worden. Ferner fehlt die Angabe über die Menge der der Butter zugesetzten Tuberkelbacillen. Da die Ergebnisse der Untersuchungen außerdem sehr wenig übereinstimmen, schien es mir sehr nötig, diese Frage noch einmal einer Untersuchung zu unterziehen.

Die gewöhnliche Butter ist sehr reich an Keimen. Die peritoneale Injektion derselben ruft beim Meerschweinchen sehr oft eine akute tötende Peritonitis hervor. Beim Pasteurisieren des Rahms geht der größte Teil dieser pathogenen Organismen zu Grunde und das Einspritzen von Butter aus solchem Rahm ruft, wie Grassberger[1]) nachgewiesen hat, gewöhnlich keine größeren Veränderungen hervor. Ich habe deshalb bei meinen Untersuchungen nur Butter aus pasteurisiertem Rahm benutzt, und zwar teils aus angesäuertem solchen, teils aus Süßrahm. Die erstere habe ich aus der Meierei der staatlichen Landwirtschaftsschule zu Ultuna durch freundliches Entgegenkommen des Herrn Ingenieur E. Peterson bekommen. Ich nehme gern die Gelegenheit wahr, diesem Herrn meinen Dank auch hier auszusprechen. In dieser Meierei wird der Rahm durch Erwärmen 5 Minuten bei 85° C pasteurisiert. Von den damit injizierten Meerschweinchen sind nur 3 an akuter Bauchfellentzündung eingegangen. Bei der Bereitung wurde der Butter 4 Proz. Salz zugesetzt. Die Süßrahmbutter wurde in einer Meierei der Stadt gekauft. Auch diese war aus pasteurisiertem Rahm hergestellt und mit 4 Proz. Salz versetzt. Die Proben wurden immer denselben Tag benutzt, an dem sie hergestellt waren.

Die Butter wurde mit der bestimmten Menge Kultur des Tuberkelbacillus durch langes Arbeiten in einem sterilen Mörser gut vermischt. Die infizierte Butter wurde, gut verpackt, in einem sterilen Gefäße bei kühler Temperatur, + 6 à + 8° C, aufbewahrt. Beim Infizieren der Tiere wurde die von Obermüller[2]) angegebene Methode befolgt. Die bei 40° C geschmolzene Butter wurde 20 Minuten centrifugiert. Dabei war es nötig, die Centrifugröhren mehrmals wieder bis 40° zu erwärmen. Nachdem die Fettschicht sorgfältig entfernt war, wurde von dem Bodensatze unter aseptischen Vorsichtsmaßregeln 1—2 ccm anfangs und weiter zu bestimmten Zeiten Meerschweinchen intraperitoneal eingespritzt. Von den längere Zeit aufbewahrten Butterproben wurde nie die oberste

1) Grassberger, Münch. med. Wochenschr. 1899.
2) Obermüller, Hyg. Rundsch. 1899.

Schicht zum Einspritzen benutzt. Das Gewicht der Tiere wurde jede Woche kontrolliert. Nach 5—6 Wochen wurden die nicht gestorbenen Tiere getötet.

Bei diesen Versuchen war eine Verwechselung des Tuberkuloseerregers mit anderen säurefesten Bakterien nicht allzu sehr zu befürchten. Durch das Pasteurisieren dürften die meisten Stäbchen vernichtet worden sein. Sollten auch einige von ihnen diesen Prozeß überlebt haben, würden sie keine tuberkuloseähnlichen Veränderungen hervorrufen, weil dazu Anwesenheit von Fett nötig zu sein scheint, wie Grassberger[1]) nachgewiesen hat. Jedoch habe ich es für nötig gehalten, die in den entstandenen Veränderungen vorkommenden Bakterien als Tuberkelbacillen zu identifizieren. Zu diesem Zwecke sind Impfungen der Kranheitsprodukte besonders auf Kaninchen empfohlen, die gegen die anderen säurefesten Organismen nicht empfindlich sein sollen. Kulturen auf Glycerinagar sind nicht geeignet, weil etwa vorhandene andere säurefeste Bakterien die Tuberkelbacillen überwachsen. Da die erforderliche Menge Kaninchen mir nicht zur Verfügung stand, habe ich das Kulturverfahren benutzt, statt Glycerinagar aber Heyden-Agar verwendet. In der That ist es mir auch in allen Fällen gelungen, wenn nicht reichliche Verunreinigung mit Kokken vorkam, Kulturen zu bekommen, welche auf Glycerinagar das dem Tuberkelbacillus charakteristische Wachstum zeigten. Andere säurefeste Bakterien habe ich nie getroffen. Ob das Verfahren dazu geeignet ist, die Tuberkelbacillen von diesen zu scheiden, wenn sie gemischt sind, muß deshalb dahingestellt bleiben. Die Menge der Bacillen in den tuberkulösen Produkten habe ich durch Anfertigung von Trockenpräparaten zu schätzen versucht.

Versuchsreihe I.

250 g Meiereibutter erster Sorte aus angesäuertem, pasteurisiertem Rahm wurde mit abgeschabten Massen von 3-wöchentlichen Agarkulturen gemischt. Die Butter stammte aus Ultuna, enthielt 4 Proz. Salz und war an demselben Tage hergestellt worden. Der Bacillenzusatz wurde größer als beabsichtigt war. Trockenpräparate aus dem Bodensatz nach dem Centrifugieren enthielten gewöhnlich mehr als 100 Bacillen in jedem Gesichtsfelde. Vom Bodensatze wurden jedem Tiere 2 ccm injiziert. Wegen der Größe des Tuberkelbacillengehaltes wurden nur große Tiere zum Versuche benutzt. Alle Tiere, No. 9 ausgenommen, waren Männchen, nur No. 10 ist spontan eingegangen, die übrigen wurden getötet. Zur Kontrolle wurden einem Tiere 2 ccm Bodensatz nicht infizierter Butter injiziert (s. Tabelle p. 280).

In der Zeit von 4 Wochen hat also in diesem Falle keine Abtötung der Tuberkelbacillen stattgefunden. Von den Meerschweinchen war nur eins frei von tuberkulösen Veränderungen. Aus der Versuchsreihe geht jedoch hervor, daß das Virus bedeutend abgeschwächt worden ist. Die nach Injektion anderthalb Wochen alter Butter entstandenen Veränderungen sind entweder nicht so hochgradig mit nur kleinen, nicht käsigen Knötchen oder nur an der Injektionsstelle zu finden. Der Versuch stimmt sehr gut mit dem von Heim überein.

Die Menge der Tuberkelbacillen ist in dieser Probe sehr bedeutend viel größer, als sie wohl jemals in der Marktbutter getroffen wird. Der Versuch entspricht deshalb keineswegs den gewöhnlichen Verhältnissen.

---

1) Grassberger, a. a. O.

Deshalb wurden 2 neue Versuchsreihen mit kleineren Mengen Tuberkelbacillen angestellt.

No. des Tieres	Aufbewahrungszeit der Butter	Gewicht der Tiere bei der Infektion	nach 1 Woche	nach 2 Wochen	nach 3 Wochen	nach 4 Wochen	Lebenszeit in Wochen	Sektionsbefund
I.	Kontrolle	545	560	550	536	570	5	Ganz negativer Befund.
II.	0 Tag	610	570	540	505	460	5	Zahlreiche Knötchen im Omentum und Milzhilus, einer in der linken Lunge.
III.	4 Tage	710	620	595	570	550	6	Gewicht 510 g. Zahlreiche, käsige Knötchen an der Injektionsstelle, im Omentum, Leber und Milz. Einige Knötchen waren mehr als linsengroß.
IV.	7 „	690	650	590	535	485	6	Gewicht 480 g. Linsengroße, käsige Knötchen im Omentum, Leber und an der Injektionsstelle. Milz und Lunge frei.
V.	11 „	690	630	600	595	580	6	Gewicht 535 g. Abgemagert, sonst keine Veränderungen.
VI.	14 „	685	670	650	645	625	6	Gewicht 610 g. Linsengroßer, subkutaner Absceß an der Infektionsstelle mit wenigen Tuberkelbacillen. Sonst negativer Befund.
VII.	18 „	640	595	545	510	515	6	Gewicht 460 g. Linsengroße Knötchen an der Injektionsstelle mit wenigen Bacillen. Sonst keine Veränderungen.
VIII.	21 „	725	675	645	635	620	6	Gewicht 560 g. Beinahe bohnengroßer, käsiger Abcseß an der Injektionsstelle, mäßig reich an Bacillen.
IX.	25 „	502	405	385	380	355	6	Gewicht 355 g. Einige kleine, höchstens stecknadelkopfgroße, harte, feste Knötchen, ohne Käse im Omentum und an der Injektionsstelle mit Bacillen.
X.	28 „	535	480	455	445	420	5½	Gewicht 320 g. Kleine, feste Knötchen im Omentum ohne Käse, mäßig reich an Tuberkelbacillen.

Versuchsreihe II.

250 g Meiereibutter erster Sorte aus pasteurisiertem Süßrahm wurden mit soviel von einer 9 Wochen alten Tuberkelbacillenkultur vermischt, daß die Präparate aus dem Bodensatze im Gesichtsfelde ungefähr 50 Bacillen enthielten. Der Butter waren bei der Bereitung 4 Proz. Salz zugesetzt worden. Die Lake enthielt 17,6 Proz. Als Kontrolle wurde ebensoviel, 2 ccm, Bodensatz der nicht infizierten Butter einem Tiere eingespritzt (s. Tabelle p. 281).

In dieser Versuchsreihe sind die der Butter zugesetzten Tuberkelbacillen nach 3 Wochen nicht mehr imstande, Meerschweinchen zu infizieren. Schon nach 2 Wochen dürften sie abgeschwächt sein, denn die Veränderungen bei dem nach dieser Zeit infizierten Tiere sind nicht sehr groß. Das Tier ist auch nicht spontan eingegangen.

No. und Geschlecht des Tieres	Aufbewahrungszeit der Butter	Gewicht der Tiere					Lebenszeit in Woch.		Sektionsbefund
		bei der Infektion	nach 1 Woche	nach 2 Wochen	nach 3 Wochen	nach 4 Wochen	getötet	gestorben	
I. ♀	Kontrolle	530	420	440	430	400	5		Gewicht 415 g. Völlig negativer Befund.
II. ♂	0 Tag	550	445	435	360			3	Hanfkorngroße Knötchen an der Injektionsstelle mit zahlreichen Bacillen.
III. ♂	7 Tage	425	405	385	380	300		4	Mehrere hanfkorngroße, käsige Knötchen in der Leber, zahlreiche stecknadelkopfgroße im Omentum. Besonders die Leberknötchen enthielten reichlich Bacillen.
IV. ♀	14 „	560	530	495	450	430	6		Gewicht 365 g. Einzelne kleine, feste Knötchen im Omentum mit wenigen Bacillen; sonst negativer Befund.
V. ♀	21 „	450	410	410	380			$3^1/_2$	Gewicht 320 g. Keine tuberkulösen Veränderungen. Darm injiziert. Das Tier hatte die letzten Tage Durchfall.
VI. ♀	28 „	510	475	420	375	360	6		Gewicht 300 g. Ganz negativer Befund.

Versuchsreihe III.

Zu 250 g Butter derselben Probe, wie im vorigen Versuche, wurden noch 5 g steriles Salz zugesetzt. Nachdem das Salz gut verteilt worden war, war die Salzmenge der Lake, durch Titrieren bestimmt, 29,3 Proz. Sodann wurde die Butter mit ebenso großer Menge Tuberkelbacillen derselben Kultur wie im vorigen Versuche versetzt. Nach dem Centrifugieren der geschmolzenen Butter wurden jedem Tiere 2 ccm des Bodensatzes eingespritzt. Die Kontrolle wurde ausgelassen, da der Versuch mit derselben Butter wie der des vorigen Versuches angestellt war.

No. und Geschlecht des Tieres	Aufbewahrungszeit der Butter	Gewicht					Lebenszeit in Woch.		Sektionsbefund
		bei der Infektion	nach 1 Woche	nach 2 Wochen	nach 3 Wochen	nach 4 Wochen	getötet	gestorben	
I. ♀	0 Tag	445	385	365	340	320		7	Gewicht 240 g. Hanfkorngroße Knötchen im Omentum und in der Leber.
II. ♀	7 Tage	540	520	460	430	445	8		Gewicht 460 g. Keine Veränderungen.

Bei diesem höheren Salzgehalte ist das Absterben der Tuberkelbacillen sehr rasch eingetreten. Zu bemerken ist jedoch, daß kaum alle Tuberkelbacillen sehr lebenskräftig waren, da sie aus einer ziemlich

alten Kultur stammten. Dies dürfte auch zu dem verhältnismäßig günstigen Resultate bei einer ziemlich großen Bacillenmenge beigetragen haben. Bei den weiteren Versuchen wurden nur kräftige Bacillenkulturen benutzt, der Zusatz davon aber kleiner genommen.

Versuchsreihe IV.

Eine kleine Menge Meiereibutter erster Sorte aus angesäuertem, pasteurisiertem Rahm wurde mit Tuberkelbacillen von einer 3 Wochen alten Kultur auf Heyden-Agar versetzt und in gewöhnlicher Weise gut gemischt. Eine Probe davon wurde verflüssigt und centrifugiert. Nach Maßgabe der Menge in dem Bodensatze gefundener Bacillen wurde soviel frische Butter zugesetzt, daß bei erneuerter Untersuchung in den Präparaten höchstens 5—8 Bacillen in jedem Gesichtsfeld waren. Von dem Bodensatze wurde nur 1 ccm eingespritzt. Die Butter war mit 4 Proz. Kochsatz hergestellt.

No. und Geschlecht des Tieres	Aufbewahrungszeit der Butter	Gewicht					Lebenszeit in Woch.		Sektionsbefund
		bei der Infektion	nach 1 Woche	nach 2 Wochen	nach 3 Wochen	nach 4 Wochen	getötet	gestorben	
I. ♂	Kontrolle	710	625	590	430	340		4	Bohnengroßer, subkutaner Absceß in der Leistengegend hinter der Injektionsstelle mit Kokken und nicht säurefesten Stäbchen. Sonst keine Veränderungen.
II. ♂	0 Tag	370	345	355	305	205		4	Hanfkorngroße Knötchen im Omentum und 2 noch größere in der rechten Lunge. Alle enthielten ziemlich zahlreiche Bacillen.
III. ♀	0 „	470	435	410	325	230		4½	Gewicht 210 g. An der Injektionsstelle eine linsengroße Ulceration mit käsigem Belage und Knötchen in der Umgebung. Hanfkorngroße und noch größere, käsige Knötchen in Omentum und Leber. Zahlreiche Bacillen.
IV. ♀	5 Tage	360	360	390	360	210	4		Hatte die letzten Tage Diarrhöe, magerte ab und wurde deshalb getötet. Sektionsbefund völlig negativ.
V. ♀	5 „	620	440					1	Abort. Absceß mit Kokken im kleinen Becken.
VI. ♀	10 „	730	730	715	500	440		4½	Gewicht 440 g. Hämorrhagische Peritonitis mit Kokken.
VII. ♀	10 „	740	695	530	480	500	6		Gewicht 525 g. Ganz negativer Befund. Das Tier hat 2 Wochen nach der Injektion 2 lebende Junge geboren.

In diesem Versuche scheinen die Tuberkelbacillen wenigstens nach 10 Tagen so viel an Virulenz eingebüßt zu haben, daß sie Meerschweinchen nicht weiter infizieren. Um zu sehen, ob die saure Reaktion dazu

wesentlich beiträgt, wurde gleichzeitig mit diesem auch eine Versuchsreihe mit Süßrahmbutter angestellt. Obwohl der Rahm pasteurisiert war, gingen jedoch die meisten Tiere nach wenigen Tagen an eiteriger Bauchfellentzündung zu Grunde. Nur zwei anfangs und ein nach 10 Tagen geimpftes Tier lebten längere Zeit. Das letztere ging nach 3 Wochen unter chronischer fibrinopurulenter Bauchfellentzündung ein. Im Omentum wurden mehrere sehr kleine Knötchen mit säurefesten Stäbchen gefunden. Nach 10 Tagen waren also in dieser Butter die Tuberkelbacillen noch infektiös, wenn die gefundenen Stäbchen solche waren, was ja wenigstens sehr wahrscheinlich scheint. Ihre Kultur ist nicht gelungen. Nach dieser Beobachtung zu schließen, würde die Süßrahmbutter weniger schädlich auf die Tuberkelbacillen wirken, als die saure Butter. Es ist aber zu bemerken, daß das Tier durch die chronische Bauchfellentzündung herabgekommen war.

Versuchsreihe V.

200 g derselben Butter wie im vorigen Versuche wurden mit noch 4 g sterilen Salzes gemischt. Danach wurden auf dieselbe Weise wie in voriger Probe ebensoviel Tuberkelbacillen gleich alter Kultur zugesetzt. Vom Bodensatze wurde 1 ccm jedem Tiere eingespritzt.

No. und Geschlecht des Tieres	Aufbewahrungszeit der Butter	Gewicht					Lebenszeit in Woch.		Sektionsbefund
		bei der Infektion	nach 1 Woche	nach 2 Wochen	nach 3 Wochen	nach 4 Wochen	getötet	gestorben	
I. ♂	0 Tag	500	460	410	320	280		4	Zahlreiche käsige Knötchen im Omentum, an der Bauchwand und um die linke Niere; viele Bacillen.
II. ♀	0 „	660	560	560	450	395		4	Zahlreiche stecknadelkopfgroße Knötchen im Omentum, hanfkorngroße in der Leber. Viele Bacillen.
III. ♀	5 Tage	675	535	525	365	300		4	Linsengroßer Absceß im Omentum mit Kokken. Keine tuberkulösen Veränderungen.
IV. ♀	5 „	590	625	590	440	360		4½	4 stecknadelkopfgroße, harte Knötchen im Omentum mit wenigen Bacillen. Cirkumskripte, eiterige Entzündung zwischen Magen, Leber und Milz.
V. ♀	10 „	570	425	480	490	505	5½		Gewicht 500 g. Ganz negativer Befund.

Nach 5 Tagen sind die Bacillen noch imstande, eine Infektion hervorzurufen. Regelmäßig tritt sie aber nicht ein.

Der Salzgehalt kann in diesen Versuchen ein wenig groß erscheinen. In der That ist er aber sicherlich nicht so hoch gewesen. Wenn die zum Versuche II benutzte Butter wirklich 4 Proz. Salz enthalten hätte, ist es unmöglich, daß durch Zusatz von nur 2 Proz. Salz der Prozentgehalt der Lake von 17,6 bis 29,3 Proz. steigen könne. Die Zahlen 3 und 5 dürften eher dem Gehalt an Salz der Proben des 2. und 3. Versuches

entsprechen. Eine sehr genaue Bestimmung der Salzmenge hat auch keine so große Bedeutung für diese Untersuchung, die nur beabsichtigt, festzustellen, ob die Tuberkelbacillen in der Butter in kurzer Zeit zu Grunde gehen können.

Bei diesen Versuchen war eine Abnahme der Virulenz der der Butter beigemischten Bacillen überall wahrzunehmen. Aber nur wenn der Zusatz klein war, wurde die Infektionsfähigkeit völlig aufgehoben. Die Ursache, daß die verschiedenen Untersucher, insbesondere Laser und Dawson, zu ganz abweichenden Ergebnissen gekommen sind, dürfte wenigstens teilweise auf den Unterschied in der Größe der Einsaat zurückzuführen sein. Es ist ja ohne weiteres klar, daß in einer großen Menge Bakterien mehr widerstandsfähige Individuen vorkommen als in einer kleinen. Auch dürfte die Zahl der Bacillen, welche der Salz- und Säurewirkung in der Butter entzogen sind, bei großem Zusatz von Bacillen größer sein als bei kleinem. Weiter ist darauf Rücksicht zu nehmen, daß bei großer Beimengung von Bacillen zu der Butter die toten Bacillen auf das Versuchstier unzweifelhaft schädlich einwirken und die Infektion durch die eventuell noch lebenden begünstigen. Auf der Giftwirkung toter Bakterien dürfte vielleicht die regelmäßige Abnahme des Gewichtes auch der von Tuberkulose nicht angegriffenen Tiere beruhen. Ob alle Bacillen zu der Zeit wirklich getötet waren, nach welcher beim Einspritzen der Butter keine Tuberkulose bei den Tieren mehr entstand, muß übrigens dahingestellt bleiben. Praktisch gesehen, ist es aber für den Zweck dieser Untersuchung genügend, daß die Tuberkelbacillen in der Salzbutter nach kurzer Zeit die Fähigkeit, Meerschweinchen zu infizieren, verlieren können. Die dazu nötige Zeit braucht auch nicht sehr groß zu sein. Im Vergleich mit Marktbutter dürften auch die 2 letzten Proben wahrscheinlich sehr reich an Bacillen gewesen sein. Indes waren diese wenigstens nach 10 Tagen mit der Impfungsmethode nicht mehr nachzuweisen. Aehnliches kann selbstverständlich auch bei der natürlichen Infektion der Butter mit Tuberkelbacillen vorkommen. Bei den Untersuchern kommen zuweilen sogar Angaben vor, die auf eine Abschwächung des Virus hindeuten können. Tobler z. B. fand bei nur je einem Tiere tuberkulöse Veränderungen, obwohl 4 bezw. 3 aus derselben Probe eingespritzt worden waren.

Obermüller[1]) scheint, betreffend Vorkommens von Bakterien, zuerst dem Salzgehalt der Butter einige Bedeutung zugemessen zu haben. Von den übrigen, Schuchardt ausgenommen, ist höchstens nur nebenbei bemerkt worden, daß unter den Proben auch Salzbutter vorkam. Die Bedeutung der anderen oben angeführten Umstände für den etwaigen Befund von Tuberkelbacillen in der Butter hat Hellström[2]) genau hervorgehoben. Ich kann ihm nur beistimmen, wenn er sagt: „Das Vorkommen oder Fehlen dieser Bacillen wie anderer Keime in der Butter hängt jedoch von so vielen Umständen ab, daß man nicht berechtigt ist, die Resultate nur nach der Provenienz der Butter zu deuten, sondern auch im Verhältnis zu der chemischen Beschaffenheit der Butter, deren Alter, Aufbewahrungs- und Darstellungsweise u. s. w.“

Das verhältnismäßig rasche Absterben des Tuberkelbacillus in der Salzbutter steht in schroffem Gegensatze zu seinem Verhalten im ge-

1) Obermüller. a. a. O.
2) Hellström, a. a. O.

salzenen Fleische. Die Infektionsfähigkeit tuberkulös veränderter Organe soll nach de Freytag[1]) durch ein 3 Monate lang dauerndes Einsalzen nicht aufgehoben werden. Der Reichtum an Bacillen spielt vielleicht auch hier eine Rolle. Galtier hat auch ein besseres Resultat des Einsalzens bekommen. Vielleicht sind auch die Ernährungsverhältnisse in der Butter ungünstiger als im Fleische.

Ueber die Bedeutung der Tuberkelbacillen in Molkereiprodukten wird gerade jetzt nach Koch's Veröffentlichung über die Nichtübertragbarkeit der Rindertuberkulose auf Menschen viel gestritten. Wenn auch die Infektion vom Darme aus bei Kindern seltener zu sein scheint, als man vorher anzunehmen geneigt war, so giebt es doch ein genügend langes Stück des Verdauungskanals, von dem ein Eindringen dieses Infektionserregers nicht ausgeschlossen ist, nämlich die Mundhöhle und den Schlund. Bei den Schweinen ist eine Fütterungstuberkulose, von dieser Stelle ausgegangen, nicht ungewöhnlich. Es scheint nicht unwahrscheinlich, daß auch die Tuberkulose der Halsdrüsen bei Kindern ihre Herkunft demselben Ursprunge verdanken kann. Unter solchen Verhältnissen ist wenigstens vorläufig die Bedeutung der Anwesenheit dieses Krankheitserregers auch in der Butter nicht zu unterschätzen. Um zu einer richtigen Auffassung über die Frequenz des Tuberkelbacillus in diesem Nahrungsmittel zu kommen, ist es offenbar nötig, die Untersuchungen mit viel größerer Genauigkeit anzustellen, als es vorher oft geschehen ist.

Upsala, Mai 1902.

Bothriocephalus latus Brems. chez le chat.

Par le Dr. **B. Galli-Valerio,**
Prof. à la Faculté de médecine de Lausanne.

La question de la présence de *B. latus* Brems. chez le chat, n'est pas encore complètement résolue. On sait que Braun, ayant fait ingérer à des chats, des larves de *B. latus*, a obtenu le développement de ce ver dans leur intestin. Seulement ils étaient plus courts, à chaîne formée par un nombre moindre d'anneaux, à tête plus petite que *B. latus* développé chez l'homme dans le même laps de temps.

Non obstant cette démonstration expérimentale, on persiste à avoir des doutes sur la présence spontanée de *B. latus* chez le chat.

La première indication de la présence de Bothriocéphales chez le chat est due à Creplin. En 1825 cet observateur trouva chez un chat à Greifswald, 2 Bothriocéphales. Il s'agissait de deux exemplaires très jeunes, de la longueur, l'un de 4,5, l'autre de 6,6 mm, à tête allongée, obtuse avec deux fossettes latérales béantes en avant, et formées dans la majeure partie de leur longueur par suite du rapprochement des lièvres. Creplin, en fit une espèce particulière: *B. felis*, groupée par Diesing avec *B. decipiens* des félidés sauvages.

Krabbe a à son tour retrouvé des Bothriocéphales longs de 15 à 22 cm chez des chats à Copenhague, et les considéra différents

---

1) de Freytag, Arch. f. Hygiene. Bd. XI. 1890.

de *B. latus*. Des Bothriocéphales ont été trouvés chez le chat aussi par Alexandrini, Ercolani, Zschokke et Perroncito[1]), et ce dernier considère les exemplaires qu'il a recueillis comme très analogues à *B. latus*.

Les autres helminthologistes ne sont pas d'accord sur la question. Braun[2]) dit que le chat est un hôte rare du *B. latus*; Railliet[3]) considère comme non douteuse l'occurrence spontanée de *B. latus* chez le chat, et croit que les différences notées peuvent fort bien tenir à l'influence du milieu; Neumann[4]) ne se prononce pas et groupe pour le moment les Bothriocéphales du chat sous la dénomination de *B. felis*, tout reconnaissait que par leurs caractères généraux, sinon par leur taille ils se rapprochent de *B. latus*; Parona[5]) considère le Bothriocéphale du chat comme *B. felis*, et tout dernièrement Ariola[6]) dans sa révision de la famille des Bothriocéphalidés, a rayé le chat des hôtes de *B. latus* et groupé les Bothriocéphales trouvés chez cet animal, sous la dénomination de *B. decipiens*. Ayant eu l'occasion de trouver dernièrement un Bothriocéphale chez un chat à Lausanne, j'en ai profité pour en faire une étude comparative avec *B. latus* de l'homme, dans le but de contribuer à éclairer l'importante question.

Observation: Chat adulte, en bon état de nutrition. Suivant les renseignements du propriétaire, depuis quelque temps l'animal fait entendre continuellement un cri plaintif. Le chat est tué dans un appareil à vide, et à l'autopsie on trouve l'intestin grêle bourré par de centaines d'exemplaires de *Dipylidium caninum* B., mélangées auxquels se trouvent quelques *Ascaris canis* Werner, et un Bothriocéphale pelotonné sur lui-même.

Les caractères présentés par ce Bothriocéphale étaient les suivants:

Teinte générale blanchâtre.

Immédiatement après avoir été sorti de l'intestin, il était long de 40 cm, les anneaux mûrs présentaient une largueur de 4 mm et une longueur de 2 mm à angles postérieurs proéminents, comme les dents d'une scie. Après avoir été placé des l'eau, il présentait une longueur de 90 cm, et les anneaux mûrs, une largueur de 4 mm, et une longueur de 5 mm avec disposition de la proéminence des angles postérieurs.

Tête en forme de massue, plus blanche que le reste du ver, longue de $1^1/_2$ mm, large de $^1/_2$ mm, parcourue presque dans toute sa longueur par 2 .... ridies latérales. La tête contenait de rares corpuscules calcaires disposés le long des bords, de forme ovoïde, à couches concentriques de $20 \times 15\ \mu$.

La tête était suivie d'un léger étranglement et d'un cou long de

1) Dem Autor ist es entgangen, daß ich *Bothriocephalus felis* in Hauskatzen von Dorpat (Zur Entwickel. d. breit. Bandw. Würzburg 1883) und *Bothriocephalus latus* in Hauskatzen von Königsberg i. Pr. (Die Leberdist. d. Hauskatze [Centralbl. f. Bakt. etc. Bd. XIV. 1893]) gefunden habe, ebenso Mühling den breiten Bandwurm in hiesigen Katzen (Arch. f. Naturgesch. Bd. LXIV. 1898. I.) *Bothr. felis* ward von mir 1883 genauer beschrieben. M. Braun.

2) Die tierischen Parasiten des Menschen. Würzburg 1895.

3) Traité de zoologie médicale. II. éd. Paris 1895.

4) Traité des maladies parasitaires non microbiennes des animaux domestiques. II. éd. Paris 1892.

5) L'elmintologia italiana. Genova 1894.

6) Archives de parasitologie. Vol. III. 1900. No. 3. p. 369.

8 mm et large de $^{1}/_{4}$ mm. Au cou suivait une chaîne formée par des anneaux larges en avant de 1 mm, en arrière de 4 mm, avec le dernier anneaux à bord postérieur arrondi.

Anneaux antérieurs à peine marquées, postérieurs présentant vers le milieu, une tatache blanche opaque formé par l'utérus. Examinés au microscope, ces anneaux présentaient les caractères suivants: présence de corpuscules calcaires assez nombreux, rares vers le centre, et formant comme une bande de chaque côté des anneaux. Ces corpuscules étaient ovoïdes, à couches concentriques, de la dimension de $20 \times 15\ \mu$. Les canaux aquifères étaient peu visibles. L'ovaire était situé sous le bord postérieur de l'anneau, formée par une partie sphérique centrale remplie d'œufs, de laquelle rayonnaient des trainées d'œufs. Utérus formé par un tube disposé en lacets, qui apparaissaient comme branches latérales, au nombre de 6 environ de chaque côté de la ligne médiane.

Vitellogènes distribués dans les champs latéraux des anneaux avec les testicules formés par de nombreuses petites vésicules.

En avant de l'utérus, sur la ligne médiane, vers le bord antérieur de l'anneau, on remarquait trois ouvertures: L'antérieure petite, ronde, placée dans un petit tubercule, c'était l'orifice du pénis qui se continuait avec un spermiducte sinueux. L'ouverture qui suivait immédiatement, à forme légèrement du demilune, était l'ouverture du vagine. La 3e ouverture plus éloignée des 2 précédentes et ronde, était l'ouverture de la matrice ou tocostome.

Oeufs, jaunâtres, ovoïdes, à double contour à opercule peu visible si on n'ajoutait pas une goute d'acide, de la dimension de $70 \times 50\ \mu$.

Le Bothriocéphale du chat que je viens de décrire, doit-il être rapporté à *B. latus* ou à *B. decipiens* de Ariola? Les caractères morphologiques que j'ai exposé, et surtout la comparaison avec de nombreux exemplaires de *B. latus* de ma collection ne me laissent pas de douter: il s'agit de *B. latus*. Le seul caractère différenciel d'avec cette espèce, telle qui'on la trouvé chez l'homme, est sa taille plus petite. Mais nous savons que les helminthes ont souvent la tendence à proportionner leur taille à celle de leur hôte. Ainsi *Ascaris canis* et *Dipylidium caninum* sont toujours bien plus petits chez le chat que chez le chien. Les recherches expérimentales de Braun, ont du reste démontré comme les larves du *B. latus* données en même temps à l'homme et au chat, se développent chez le premier sous la forme de vers de la longueur normale, tandis que chez le 2d restent très petites. J'ajouterai en outre, que la forme *tenella* de *B. latus*, qu'on observe souvent chez l'homme, peut présenter des dimensions qui la séparent beaucoup plus de *B. latus* typique que ne s'en sépare l'exemplaire du chat que je viens de décrire. Ainsi je possède un exemplaire de la variété *tenella*, éliminé par une femme avec 2 *B. latus* typiques, dont les anneaux mûrs ont une largeur de 2 mm. Je crois donc pouvoir, par ce travail, confirmer les affirmations des précédents observateurs, qui avaient placé le chat parmi les hôtes de *B. latus*, en opposition à Ariola qui l'en avait rayé.

Lausanne, 2 mai 1902.

Ueber Immunisierungsversuche mit dem Kraus'schen Bacillus der Kanincheninfluenza.

[Aus dem hygienischen Institut der Universität Halle a. S.]

Von Stabsarzt Dr. **E. Jacobitz**, kommandiert zum Institut.

In Bd. XXXI. No. 5 dies. Centralbl. berichtet Volk[1]) über einen Bacillus, den er gelegentlich einer unter den Kaninchen des staatlichen Instituts zur Herstellung von Diphtherieserum in Wien ausgebrochenen Seuche aus den inneren Organen der gestorbenen Tiere gewonnen hatte. Wie der Verf. des näheren ausführt und auch an der Hand einer vergleichenden Tabelle zu beweisen sucht, steht dieser Mikroorganismus nach seinem morphologischen, kulturellen und pathogenen Verhalten dem von Beck[2]) beschriebenen Bacillus der Brustseuche der Kaninchen und dem von Kraus[3]) gefundenen Erreger einer influenzaartigen Erkrankung derselben Tiere ohne Zweifel sehr nahe, und endlich gehört, was Volk ebenfalls bereits hervorhebt, noch ein vierter, von Roger und Weil[4]) gezüchteter Spaltpilz sicherlich auch in die nämliche Gruppe.

Am Schlusse seiner Abhandlung erwähnt Volk nun Versuche zur Immunisierung mit seinem Bacillus, die zu einem völlig negativen Ergebnis gelangten. Da von den anderen eben genannten Forschern ähnliche Experimente nicht berichtet werden und also wohl auch nicht ausgeführt worden sind, so darf die folgende kurze Mitteilung, die Immunisierungsversuche mit dem Kraus'schen Bacillus der Kanincheninfluenza betrifft und sich also auf ein zweites Glied aus der Reihe der vorhin aufgezählten Bakterien bezieht, vielleicht ein gewisses Interesse beanspruchen.

Vor etwa 2 Jahren trat unter den Kaninchen unseres Instituts plötzlich eine seuchenhafte Affektion auf, der die Tiere fast ausnahmslos erlagen, und die nach den Krankheitserscheinungen, nach dem pathologisch-anatomischen und dem bakteriologischen Befund ohne Zweifel durch den von Kraus entdeckten Bacillus der Kanincheninfluenza hervorgerufen war. In der Absicht nun, der verheerenden Ausbreitung der Epidemie wenigstens für die Zukunft in unserem Stalle Einhalt zu thun oder sie doch in ihrer Wirkung zu beschränken, befaßte ich mich auf Anregung von Herrn Prof. C. Fraenkel mit der Aufgabe, ein Verfahren zur Schutzimpfung gegen den erregenden Mikroorganismus auszuarbeiten.

Als Versuchstiere dienten ausschließlich Kaninchen, die zuerst mit abgetöteten Kulturen behandelt wurden. Zu diesem Zwecke mußten die Kulturen mindestens 2 Stunden hindurch auf 60° erwärmt werden; doch war dann, wie genaue, über 10—14 Tage ausgedehnte

1) Volk, Richard, Ueber eine Kaninchenseuche. (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. XXXI. 1902. p. 177.)

2) Beck, M., Der Bacillus der Brustseuche bei Kaninchen. (Ztschr. f. Hygiene. Bd. XV. 1893. p. 363.)

3) Kraus, R., Ueber den Erreger einer influenzaartigen Kaninchenseuche. (Ztschr. f. Hygiene. Bd. XXIV. 1897. p. 396.)

4) Roger et Weil, Recherches bactériologiques sur la rhinite purulente épizootique des lapins. (Arch. de méd. expérim. et d'anat. pathol. Bd. XIII. 1901. p. 459.)

Prüfungen der Röhrchen lehrten, auch eine sichere Abtötung erfolgt. Nach der subkutanen Einspritzung zuerst ganz geringer, dann allmählich immer größerer Gaben der Bakterien machte sich stets eine Reaktion bemerklich, die namentlich in einer etwa 2 Tage währenden mäßigen Erhöhung der Körperwärme bestand, aber rasch wieder vorüberging. Selbst nach der behutsamen Steigerung der Menge des Impfstoffes auf 10—15 ganze Agarkulturen trat nun keine Spur einer Immunität ein: die Tiere erlagen der Infektion mit einer virulenten Kultur ohne jede Verzögerung.

Es wurden dann Versuche mit lebenden Bakterien angestellt, die in kleinsten Dosen, nach starker Verdünnung, besonders kräftigen Tieren eingespritzt und deren Menge nun mit großer Vorsicht ganz langsam gesteigert wurde. Es gelang so, den Tieren schließlich sehr beträchtliche Quantitäten beizubringen, so in einem Falle bis zu 15 ganzen Agarkulturen. Indessen ging auch dieses Stück bei Verabfolgung einer noch größeren Gabe dann zu Grunde, und in allen übrigen Fällen trat der Tod noch erheblich früher ein. Jedesmal ließen sich dann die charakteristischen pathologisch-anatomischen Veränderungen und auch die Bacillen mikroskopisch und durch die Züchtung nachweisen. Eine aktive Immunisierung war also auch auf diesem Wege nicht gelungen.

Auf die Benutzung bakterienfreier Filtrate für den hier in Rede stehenden Zweck verzichtete ich von vornherein, da sich die so gewonnenen Flüssigkeiten überhaupt völlig unwirksam für das Tier zeigten.

Daß auch die passive Immunisierung versagte, wird unter diesen Umständen nicht überraschen. Weder im Serum von Tieren, die mit abgetötetem, noch in solchem, die mit lebendem Material behandelt worden waren, ließ sich irgend welche Andeutung eines schützenden Einflusses ermitteln. Im Einklang damit steht die weitere Beobachtung, daß eine sichere agglutinierende Wirkung ebenfalls vermißt wurde; wenigstens erwies sich selbst das Serum des Kaninchens, das 15 lebende Kulturen erhalten hatte, nicht deutlich einem normalen Serum überlegen, das noch bei einer Verdünnung bei 1 : 200 eine unzweifelhafte Agglutination hervorrief. Uebrigens stößt die mikroskopische Prüfung dieser Erscheinung hier auf gewisse Schwierigkeiten, da die Bacillen von vornherein in ihren Bouillonkulturen oder in den mit Hilfe von Kochsalzlösung bereiteten Aufschwemmungen eine ausgesprochene Neigung besitzen, sich zu kleinen Haufen zusammenzuballen. Ich habe deshalb auch stets neben der mikroskopischen noch die makroskopische Beobachtung vorgenommen.

Aus diesen kurz berichteten, ziemlich ausgedehnten und mühsamen Untersuchungen erhellt, daß bei dem Kraus'schen Bacillus der Kanincheninfluenza eine künstliche Immunisierung nach den sonst für diesen Zweck bekannten und gebräuchlichen Verfahren nicht gelingt. Auch hierin besteht also eine Uebereinstimmung mit dem von Volk beschriebenen Bacillus; daß letzterer von dem Kraus'schen auch mit Hilfe einer spezifischen Serumreaktion nicht getrennt werden könnte, ergiebt sich aus den Beobachtungen ohne weiteres.

Ueber die gegenseitige Wirkung aufeinanderfolgender Immunisierungen im tierischen Organismus[1].

[Aus dem Hygiene-Institute der Universität Zürich.]

Von Dr. **Lorenzo Verney.**

Wenn ein Tier eine Infektion erleidet, so erwirbt es neue Eigenschaften, die es mehr oder weniger lange beibehält, oder diese werden, wenn sie schon vorhanden waren, gesteigert; es entsteht z. B. eine aktive Phagocytose gegenüber den die Infektion bewirkenden Mikroorganismen, eine baktericide oder antitoxische Wirkung der Körpersäfte etc. Die wichtigste dieser Veränderungen ist die größere Widerstandsfähigkeit, die das Tier gegen die gleiche Infektion erlangt hat, mit anderen Worten, die erworbene Immunität, die man als das Gesamtergebnis der anderen wahrzunehmenden Eigenschaften auffassen kann.

Bouchard hat zuerst gezeigt — und viele andere Autoren haben es in der Folge bestätigt — daß diese Eigenschaften nicht direkt durch die Infektionserreger hervorgebracht wird, sondern nur diese veranlaßt werden, d. h. die Infektionserreger sind die Ursache einer spezifischen Veränderung in der Biologie der Zellen, aus denen der Organismus gebildet ist. Durch die Reizwirkung der Infektionserreger oder durch die ihrer Stoffwechselprodukte, ändern die Zellen ihre Ernährungsweise und erwerben hierdurch die Fähigkeit, sich in größerer Zahl an den Infektionsherd zu begeben (Phagocyten), oder neue Substanzen abzusondern, die ihrerseits die Zusammensetzung der Körpersäfte ändern.

Die aktive Beteiligung des Organismus bei der Entstehung solcher Veränderungen ist durch eine Reihe von überzeugenden Thatsachen bewiesen, so daß man diesen Begriff als für die Wissenschaft feststehend erachten kann. Es genügt hier, einige dieser Thatsachen zu wiederholen: Die toxischen Stoffwechselprodukte der Bakterien werden im Verlaufe von wenigen Tagen durch die Nieren aus dem Organismus entfernt, während die erwähnten Veränderungen sehr lange, manchmal das ganze Leben, andauern; die Widerstandsfähigkeit des Organismus gegen eine Infektion erreicht nicht ihren Höhepunkt, wenn diese Produkte in größter Menge in ihm enthalten sind, sondern sie stellt sich allmählich ein; die Stoffe, welche die Immunität hervorbringen, bilden sich stets von neuem, wenn man dem Tiere nach und nach eine größere Menge Blut entzieht, als die gesamte in ihm enthaltene war.

Vor kurzem ist Emmerich gelegentlich des Studiums der Wirkung der Nukleasen bei der Pyocyaneus-Infektion und bei anderen Infektionen zu der alten Anschauung zurückgekehrt, daß die Stoffwechselprodukte der Bakterien die Ursache der Immunität seien. Die Bedingungen seiner Untersuchungen jedoch waren zu künstliche und spezielle, so daß es nicht angängig erscheint, sie für die Erklärung der Immunität heranzuziehen und besonders sie zu verallgemeinern.

Die von uns erwähnten Veränderungen sind von wechselnder Dauer. Issaeff[2]) fand z. B., daß das Serum von von Cholera befallen ge-

1) Erhalten am 12. Mai 1902.

2) Zeitschr. f. Hyg. 1894.

wesenen Menschen seine vorbeugende Wirkung 3 Monate nach Beginn der Krankheit verliere; Pfeiffer und Kolle[1]), daß diese Wirkung in dem Serum vom Abdominaltyphus genesener Menschen sich allmählich vermindere und schon nach 1 Jahre sehr geschwächt sei, und Stern[2]), daß sie nach 10 Jahren zumeist ganz verschwunden ist; Courmont[3]), Kasel und Mann[4]) etc. berichten, daß dasselbe Serum seine agglutinierende Wirkung im Durchschnitt nach 4—5 Monaten verliere, manchmal aber auch 10 Jahre lang behalten könne. Des weiteren kennt man seit langem gewisse Infektionskrankheiten, die sich, wie z. B. die croupöse Pneumonie, bei ein und demselben Individuum leicht wiederholen können, während andere, wie der Abdominaltyphus, eine so lange andauernde Immunität erzeugen, daß gewöhnlich ein Individuum nur einmal in seinem Leben von dieser Krankeit befallen wird. Häufig liegen die Verhältnisse in der Mitte; so giebt man z. B. zu, daß die durch die Kuhpockenimpfung erzeugte Immunität gegen die Pocken 10 Jahre dauere. Der Organismus hat also zugleich das Bestreben, in den normalen Zustand zurückzukehren; er büßt mehr oder weniger rasch die erworbenen Eigenschaften wieder ein, und verarbeitet am Ende die Stoffe in der gleichen Weise wie vor der Infektion.

Wenn nun zu einer Zeit, wo diese Eigenschaften in noch genügend hohem Grade vorhanden sind, das Tier eine zweite, von der ersten verschiedene Infektion erleidet, muß sich die Biologie des Organismus von neuem ändern, indem eine andere Ernährungsweise der Zellen eintritt, und eine neue Aenderung in der Physiologie der Phagocyten und in der Zusammensetzung der Körpersäfte stattfindet. Bleiben nun in diesem Falle die durch die erste Infektion hervorgerufenen Eigenschaften neben den durch die zweite Infektion bedingten bestehen, oder verändern sie sich? Und andererseits beeinflussen die durch die erste Infektion veranlaßten biologischen Veränderungen diejenigen, welche die zweite Infektion entstehen lassen sollte? Dies sind die Fragen, die ich zu lösen versucht habe.

Es wäre natürlich am Platze gewesen, besonders festzustellen, welche Veränderungen sich in den bactericiden, antitoxischen, agglutinierenden Fähigkeiten, in der Diapedese, der Phagocytose, den Nervenreaktionen etc. vollziehen, und hauptsächlich wäre es interessant gewesen, festzustellen, ob die Widerstandsfähigkeit von der ersten Infektion her unverändert fortdauere, ob sie gesteigert oder abgeschwächt oder völlig verschwunden sei. Aber diese Untersuchungen wären zu umfangreich und würden zu viel Zeit und zu große Mittel erfordern. Ich habe mich daher darauf beschränkt, jene Veränderung zu studieren, die auf eine einzige dieser Eigenschaften veranlaßt wird, und zwar auf die agglutinierende Fähigkeit, die eine große Bedeutung für die Diagnostik gewisser Krankheiten besitzt und die sehr leicht zu studieren und zu beobachten ist. — Da man auch fast alle jene Resultate, die man von lebenden Kulturen erhält, auch mit abgetöteten erreichen kann und es mit letzteren leichter gelingt, die Tiere am Leben zu erhalten, habe ich mich fast ausschließlich der toten Kulturen bedient.

Aber es sind keineswegs allein die Bakterien, die das Erscheinen dieser mehr oder weniger lange andauernden Veränderungen im Haus-

1) Zeitschr. f. Hyg. 1896.
2) Zeitschr. f. Hyg. 1894.
3) La semaine méd. 1897.
4) Münch. med. Wochenschr. 1899.

halte des Organismus veranlassen können. Belfanti und Carbone haben beobachtet, daß die Injektion von Zellen eines anderen Organismus die Erzeugung ähnlicher spezifischer Stoffe — heute Cytotoxine genannt — hervorbringen könne, die ihrerseits fähig sind, auf die injizierten Zellen verändernd einzuwirken; diese Erscheinung ist in der Folge durch Bordet und viele Andere eingehend studiert worden. Behring und Kitasato, Tizzoni und Cattani, Brieger und Fraenkel, Ehrlich etc. haben weiterhin gesehen, daß selbst die Injektionen von chemischen Stoffen das Auftreten antagonistischer Produkte (Gegengifte, Gegenkörper) hervorruft und die Zahl solcher Stoffe hat sich in der letzten Zeit beträchtlich vermehrt. Ich habe mir vorgenommen, zu sehen, ob auch eine successive Infektion oder wenigstens eine Injektion der abgetöteten Kulturen imstande wäre, die erworbene Fähigkeit, solche Stoffe zu erzeugen, zu ändern. — Für diese Versuche bediente ich mich hämolytischer Tiere, weil die hämolytischen Eigenschaften leicht sichtbar und besser studiert sind.

Ich muß noch bemerken, daß ich durch spezielle Verhältnisse gezwungen war, meine Untersuchungen vor ihrem Abschlusse plötzlich abzubrechen; trotzdem glaube ich, die bisher erhaltenen Ergebnisse meiner Versuche mitteilen zu dürfen.

I.

In einer ersten Versuchsreihe habe ich vier Meerschweinchen, welche ich mit den Buchstaben A, B, C und D bezeichnen werde, mit erhitzten Typhusbacillen geimpft. Vor der Impfung versicherte ich mich, daß ihr Serum keine agglutinierende Wirkung in Verdünnungen von 1 : 20 und 1 : 10 auf Typhus und Coli commune, sowie auf Cholera ausübe.

Für die Impfungen benutzte ich stets eine einzige Verdünnung von Typhusbacillen. Ich pflegte den 4 Meerschweinchen ihrem Gewichte entsprechende Mengen dieser Emulsion zu injizieren, und zwar ungefähr 1 : 20, ausgenommen dem Meerschweinchen B, das etwas mehr (1 : 16) erhielt.

Datum	Meerschweinchen	A	B	C	D
	Gewicht vor der Impfung	310 g	290 g	430 g	285 g
13. Oktober 1901	Injektionen von	1,5	1,5	2,0	1,5
17. „ 1901	„ „	5,0	5,0	5,0	5,0
23. „ 1901	„ „	5,0	5,0	11,0	5,0
27. „ 1901	„ „	4,0	8,0	4,0	—
3. Novemb. 1901	„ „	2,0	—	—	5,0
	Gesamtmenge der eingeimpften Emulsion	17,5	19,5	22,0	16,5
	Gewicht nach der letzten Impfung	365 g	350 g	440 g	345 g

Ich habe die Veränderungen in der Agglutinationsfähigkeit nicht nach jeder einzelnen Impfung geprüft, und werde ich nur die am Ende gemachten Beobachtungen anführen.

Das den Tieren entnommene Serum behielt während vieler Tage seine agglutinierenden Eigenschaften unverändert bei, so daß man, wenn es nötig erschien, die Versuche wiederholen und nachprüfen konnte.

Die Emulsion der Bakterien, die ich für die Agglutinationsversuche gebrauchte, bereitete ich nach den Angaben von Gruber. Da die mikroskopische Beobachtung im hängenden Tropfen eine genügend genaue Schätzung der Kraft der Agglutination zuließ, habe ich die makroskopische Methode, die weniger vorteilhafte Resultate giebt, nicht angewendet.

Um die erhaltenen Resultate leicht vergleichen zu können, habe ich mich bemüht, die Versuchsbedingungen, soweit sie erstere beeinflussen könnten, nicht zu ändern. Ich habe also zunächst begonnen, jene Bedingungen aufzufinden, die eine merkbare Aenderung der Resultate bewirken können.

Die Zahl der Bakterien spielt eine gewisse Rolle. Nimmt man eine zu geringe Zahl derselben, so vollzieht sich die Agglutination schwieriger und ist weniger gut sichtbar: die Bacillen geben nur kleine Häufchen und bleiben längere Zeit beweglich. Sind die Bakterien aber zu zahlreich, so findet die Agglutination gleichfalls nur schwierig statt, besonders bei einer hohen Verdünnung des Serums[1]). Diese Ausnahmefälle ausgenommen, sind in dieser Hinsicht aber keine wahrnehmbaren Unterschiede in den erhaltenen Resultaten vorhanden.

Der Einfluß der Temperatur ist ein genügend bekannter. Im Brütschranke vollzieht sich die Agglutination schneller, die Häufchen werden größer, zahlreicher und zusammenhängender; jedoch mildern sich mit der Zeit die Unterschiede.

Die Wirkung der Zeit ist offenkundig. Betrachtet man ein Präparat von einer Verdünnung von 1 : 250 nach einem Aufenthalte von einigen Minuten im Zimmer, so findet man, daß die Bacillen sich weniger beweglich zeigen, als in einem Kontrollpräparate; nach etwa 10 Minuten sind fast alle unbeweglich geworden, und außerdem zeigen sie stellenweise das Bestreben zur Haufenbildung. Sie bilden Inselchen, in denen die Bacillen nicht nur getrennt, sondern auch ziemlich voneinander entfernt sind: sie erscheinen an diesen Stellen nur näher bei einander, als im übrigen Teile des Präparates. Diese ziemlich charakteristischen Gebilde gestatten, das Eintreten der Agglutination vorauszusagen. Dieselben bilden sich natürlich in allen den Verdünnungen, in denen eine Agglutination stattfindet, aber sie erscheinen je nach der Stärke der Verdünnung langsamer oder schneller. Wie durch eine zusammenziehende Kraft getrieben, nähern sich die Bacillen, welche die Inselchen bilden, einander immer mehr und bilden am Ende kompakte Häufchen, in denen man einzelne Bakterien nicht mehr unterscheiden kann. Die Häufchen vergrößern sich durch Hinzutreten neuer Bacillen und durch Vereinigung mit benachbarten Häufchen, besonders wenn man das Präparat ein wenig schüttelt. Mit der Zeit steigert sich die Agglutination immer mehr; die Häufchen werden immer umfangreicher und besser sichtbar. Nach 3—4 Stunden kann man dieselbe auch bei Verdünnungen finden, bei denen sie zuerst fehlte, und nach 1—2 Tagen ist das Ergebnis noch leichter sichtbar.

Ich habe bemerkt, daß die Anwesenheit von Blutkörperchen einen Einfluß auf die Agglutination ausübt; dieselben scheinen in der That diese zu erleichtern, besonders bei den weniger aktiven Sera, z. B. im Anfange der Behandlung. — Vermutlich ist die Thätigkeit der Blutkörperchen nur eine mechanische, und es ist möglich, daß sie in derselben Weise wirken, wie auch die Bacillen, wenn sie etwas zahlreich im Präparate enthalten sind.

Bei Verwendung etwas älterer Kulturen, z. B. von 2—6 Tagen, in denen die Bacillen gewöhnlich schon unbeweglich sind, findet die Agglutination trotzdem statt; aber sie ist eine etwas schwächere und tritt etwas langsamer ein, als mit frischen Kulturen.

1) Vergl. Forster, Zeitschr. f. Hyg. Bd. XXII.

Wenn man an Stelle von Bouillon zur Herstellung der Bakterienemulsion die physiologische Kochsalzlösung verwendet, so sieht man, daß die Bakterien beschädigt und rasch unbeweglich werden. Da es interessant ist, den Veränderungen in der Beweglichkeit zu folgen, habe ich mich dieses Vorgehens nicht bedient.

Ich habe mich des im folgenden genauer beschriebenen Verfahrens bei meinen Versuchen bedient. — Das von mir benutzte Serum wurde, wenn es nicht genügend klar war, der Centrifugierung unterworfen. Mit einer Platinöse nahm ich ein wenig von einer 24 Stunden alten Kultur auf Agar und verteilte dieselbe in soviel Bouillon, daß diese schwach milchig getrübt war. Ich überzeugte mich von der Beweglichkeit der Bacillen unter dem Mikroskop; außerdem sorgte ich dafür, daß ich nicht zu viel oder zu wenig Bacillen in das Gesichtsfeld des Mikroskopes bekam und die Bewegungen der einzelnen Bacillen leicht verfolgen konnte. Ferner machte ich die Verdünnungen, welche ich zur Herstellung der hängenden Tropfen verwendete, und ließ sie mit ein oder zwei Kontrollpräparaten im Laboratorium, wo die Temperatur um 20° schwankte. Ich prüfte sie gewöhnlich nach 3 Stunden und dann wieder nach 17—24 Stunden in der Reihenfolge, in der sie gemacht worden waren; endlich gebe ich für jeden Fall die Zeit an, bei der die Beobachtung gemacht wurde.

Zur Beurteilung der Stärke der Agglutination sollte man eine sichere Meßmethode haben. Ich benutzte dazu hauptsächlich 2 Elemente: die Größe der Häufchen und die Beweglichkeit der Bacillen.

Die Häufchen können sehr groß, aus einer Menge von zusammengeballten Bacillen gebildet sein, die fast das ganze Präparat einnehmen und eine unregelmäßige Gestalt mit Hohlräumen besitzen, die ihnen ein netzartiges Aussehen verleihen; sie können sehr klein sein, und nur aus 3—5—10 Bacillen bestehen. Zwischen diesen 2 extremen Fällen giebt es viele dazwischen liegende; ich unterschied jedoch nur 2, die ich mit größeren und mittleren Häufchen bezeichnete. Die letzteren sind durch eine große Zahl — vielleicht etwa 20 — Bacillen gebildet; die anderen bestehen aus so vielen Bakterien, daß ihre Zahl nicht annähernd angegeben werden kann; sie sind 2-, 3-, 4mal so umfangreich wie die vorhergehenden. Ich bezeichnete diese verschiedenen Arten von Häufchen der größeren Bequemlichkeit wegen mit den Zahlen 1—4, von den größeren zu den kleineren übergehend.

Andererseits können auch die Haufen mehr oder weniger kompakt sein; sie können in größerer oder geringerer Menge im Präparate enthalten sein. Endlich kann bis zu ihrem Auftreten mehr oder weniger Zeit verstreichen.

Was die Beweglichkeit der Bakterien anbetrifft, so muß ich vorausschicken, daß zwischen ihr und der Aglutination — d. h. der Größe, der Form und der Zahl der gebildeten Häufchen — keine direkte Beziehung besteht. So können auch die agglutinierten Bacillen Bewegung zeigen. Man sieht z. B. in einer Verdünnung von 1 : 1000 oder von 1 : 2000 leicht, wie sich Bacillen von einem bereits gebildeten Haufen losreißen, sich einige Zeit frei und schnell bewegen und sich dann einem anderen Haufen anschließen. Andererseits sind in einem Präparate aus einer Verdünnung von 1 : 250, das man einige Zeit im Laboratorium läßt, nach 2—4 Stunden alle Bacillen unbeweglich; betrachtet man das gleiche Präparat nach ca. 17—24 Stunden, so findet man eine bestimmte Zahl sich bewegender Bakterien, trotzdem die Ag-

glutination in derselben Zeit deutlicher geworden ist. Auch bei schwächeren Verdünnungen erweist sich die Zahl der beweglichen Bacillen nach 24 Stunden größer als nach 2—4 Stunden. Endlich sieht man in zwei gleichen Präparaten in der Verdünnung von 1 : 250 von denen eines im Brütschranke, das andere im Laboratorium aufbewahrt wurde, in ersterem stets eine Menge sich bewegender Bacillen, obwohl die Agglutination sich viel schneller und energischer erweist. Aber nach einem Tage haben im Brütschranke die frei beweglichen Bakterien an Zahl sehr abgenommen oder sie fehlen ganz: bei dem im Zimmer gelassenen Präparate findet man dagegen noch nach 2—3 Tagen frei bewegliche Bacillen. — Außerdem beobachtet man noch andere Verschiedenheiten in den beiden Präparaten; so ist z. B. im Brütschranke die Bewegung der schwimmenden Bakterien eine sehr lebhafte und die Gesamtzahl der Bakterien hat sich beträchtlich vermehrt.

Zum Zwecke einer Einteilung der Beweglichkeit der Bacillen müssen wir vor allem jene freien und beweglichen von denen unterscheiden, die wohl isoliert, aber unbeweglich sind. Solche findet man häufig in Präparaten, in denen die Agglutination sehr stark ist und alle Bakterien unbeweglich sind. Ferner kann man Bacillen beobachten, die beweglich sind, aber ihren Platz nicht verändern können, da sie mit einem Punkte ihres Körpers an einem Häufchen festgehalten sind; ihre Bewegung ist dann eine mehr oder weniger lebhaft oscillierende oder vibrierende, analog der Brown'schen; sie werden dann nach einiger Zeit unbeweglich oder reißen sich los. Diese Bacillen findet man nur wenig zahlreich und besonders in Präparaten, in denen sich keine frei beweglichen Bakterien zeigen; man kann also diesen Fall der völligen Unbeweglichkeit unmittelbar folgend betrachten. Die ganz frei schwimmenden Bacillen können in sehr kleiner Zahl vorhanden sein, so daß man sie im Präparate suchen muß; oder sie sind wenigstens so zahlreich, daß man stets einige im Gesichtsfelde des Mikroskopes wahrnimmt; ferner können sie fast die Hälfte aller anwesenden Bacillen ausmachen; und endlich können sie noch reichlicher — bis zu 4 : 5—9 : 10 aller vorhandenen Bakterien — sein. — Ich werde in der Folge diese Grade der Beweglichkeit mit den fortlaufenden Zahlen von 1'—5' bezeichnen.

Ich glaube, daß diese Meßmethoden genau genug sind und daß sie eine leichte Kontrolle und ausreichende Vergleiche erlauben, sowie daß sie vorteilhafter seien, als die von Deutsch[1]) und von Köhler[2]) vorgeschlagenen. Ersterer zählt die Zahl der Häufchen im Felde des Mikroskopes; aber diese Zahl wechselt, je nachdem man den Rand oder die Mitte des hängenden Tropfens beobachtet: die Häufchen, die vorzugsweise am Rande des Tropfens auftreten, zeigen in der That immer das Bestreben, sich nach der Tiefe auszugleichen. Auch durch die Konzentration der verwendeten Emulsion wird die Zahl der Häufchen beeinflußt. — Kölzer benutzt einzig die Beweglichkeit der Bacillen; wir haben aber gesehen, wie leicht sich diese mit der Zeit ändert.

Bei der Prüfung aller 4 Meerschweinchen zeigt sich, daß ihr Serum fast ganz gleich wirkt.

Bei einer Verdünnung von 1 : 100 tritt die Agglutination fast unmittelbar ein; es entsteht ein großer, kompakter, mehr oder weniger netzförmiger Haufen und mehrere weniger große Häufchen. Es zeigen

---

1) Centralbl. f. Bakt. etc. Abt. I. Bd. XVIII.
2) Zeitschr. f. Hyg. Bd. XXXVI.

sich weder freie noch bewegliche Bacillen, selbst nicht nach 1 bis 2 Tagen.

Bei 1 : 250 erfolgt die Agglutination auch sehr rasch, in einigen Minuten. Nach $1^1/_2$ Stunden findet man eine gewisse Zahl freier und sehr wenige bewegliche Bacillen (2'), die Häufchen sind groß (2), aber nicht sehr kompakt. Nach 2—4 Stunden findet man keine beweglichen Bacillen mehr, die Häufchen sind kompakter, größer und weniger zahlreich geworden. Nach 1 Tage sieht man von neuem bewegliche Bacillen; ihre Zahl ist ziemlich erheblich (3'); die Häufchen sind noch größer geworden.

Bei 1 : 1000 finden sich die beweglichen Formen stets, sind aber nach 3—4 Stunden wenig zahlreich und ihre Bewegungen langsame; dann wächst ihre Zahl und die Schnelligkeit der Bewegung wieder. In dieser Verdünnung beginnt die Agglutination noch ziemlich rasch und ist schon nach 20 Minuten offenbar. Die Häufchen sind gut sichtbar, kompakt, groß (2), aber nicht so sehr, wie in dem vorhergehenden Falle.

Bei 1 : 2000 ist die Agglutination, wie eben, gleichfalls schon nach ca. 20 Minuten sichtbar. Nach 1—2 Stunden sieht man freie Formen in ziemlich geringer Zahl und werden dann immer zahlreicher. Die Häufchen erreichen nach 2—4 Stunden mittlere Größe (3), und nehmen in der Folge etwas an Umfang zu.

Bei 1 : 6000 unterscheiden sich die Resultate wenig von den vorausgehenden; nur erscheint die Agglutination später, etwa nach 1 Stunde.

Bei 1 : 10000 bemerkt man nach 1 Stunde eine Verlangsamung der Bakterienbewegung und einige kleine Häufchen; nach 2—3 Stunden ist die Agglutination gut erkennbar, aber noch immer schwach (4). Sie vergrößert sich im Laufe eines Tages ein wenig. Eine große Zahl von Bacillen bleibt stets frei und beweglich (5'). In dieser Verdünnung waren die Häufchen bei dem Serum von Meerschweinchen B ein wenig besser sichtbar, als bei den drei anderen.

Bei einer Verdünnung von 1 : 15000 bemerkt man keine wichtige Agglutination mehr, sondern nur das Bestreben: die Bacillen nähern sich, vereinigen sich und sondern sich nach einiger Zeit von neuem ab, ohne wirkliche Häufchen zu bilden. Allein Meerschweinchen B gab kleine Häufchen von 2—3 Bacillen.

Man kann sagen, daß die Verdünnung von 1 : 10000 die obere Grenze für eine Wirksamkeit des Serums dieser 4 Tiere bildete. Offenbar giebt es hier keine markanten individuellen Unterschiede: die 4 gleich behandelten Meerschweinchen gaben praktisch gleichwertige Resultate.

Diese Beobachtungen sind hauptsächlich mit am 6. und 8. November entnommenen Serum gemacht, aber auch mit einem an den folgenden Tagen entnommenen Serum wiederholt worden.

Das am 8. November dem Meerschweinchen C entnommene Serum, welches Bact. typhi stark agglutinierte, zeigte keine agglutinierende Wirkung auf Bact. coli commune in Verdünnung von 1 : 20 und 1 : 10.

Am 8. November wog das Meerschweinchen C 430 g. Es erhielt 5 ccm einer Emulsion von erhitzten Coli und am 12. und 20. nochmals je 10 ccm. Auf diese letzte Injektion hin erkrankte das Tier sehr, am 29. wog es nur 390 g; dann erholte es sich wieder langsam und wog am 20. Dezember 428 g.

Der zur Impfung verwendete Coli war von einer typischen Art, erzeugte Indol, vergärt Glukose und Milchzucker, entwickelt auf einfachem Agar Gas, bringt Milch innerhalb 24 Stunden zur Gerinnung, wobei sie stark sauer wird, peptonisiert sie aber nicht; auf Kartoffeln giebt er nach 1 Tage einen weißlichen, crêmeartigen Belag, der sich nach 2 Tagen dunkler färbt. — Die Bacillen sind etwas breiter und im Durchschnitt kürzer als die Typhusbacillen, mit abgerundeten Enden, vereinzelt oder sehr selten paarweise; nur 1—2mal bemerkte ich Ketten von 4—5 Gliedern. Oft findet man unregelmäßige Individuen, z. B. mit einem sehr dicken Auswuchse oder in der Mitte angeschwollen oder sehr kurz und dick; sie bewegen sich in der Flüssigkeit wie die anderen. Wenn man ein wenig von einer Kultur auf Agar, die 15 bis 24 Stunden alt ist, in Bouillon verdünnt, bemerkt man eine viel geringere Beweglichkeit, als in einem auf gleiche Weise hergestellten Präparate von Typhus; und eine größere oder geringere Zahl von Individuen ist ganz unbeweglich; aber nach 2—8-stündigem Stehen im Laboratorium sind die Bacillen so beweglich wie die von Typhus.

Ich glaubte nicht, die für den Typhus befolgte Methode ändern zu müssen, da sich der Coli wie der Typhus verhält.

Ich werde zuerst von der Agglutination sprechen, die das Serum von Meerschweinchen C auf den Coli ausübt, und dann die Wirkung auf die Typhusbacillen besprechen.

Am 9. November fand keine Agglutination auf Coli bei einer Verdünnung von 1 : 25 statt; am 10. fehlte sie gleichfalls oder war zweifelhaft; am 11. war sie bei Verdünnung von 1 : 25 wahrnehmbar (3'), ebenso zeigte sie sich bei einer Verdünnung von 1 : 100 (4'). Es ist ja eine bekannte Thatsache, daß sich die Agglutination beim Fortschreiten der Impfung mit getöteten oder lebenden Kulturen stets einige Zeit später einstellt und sich dadurch als etwas anderes als eine reine Infektionswirkung zeigt. Diese Thatsache offenbart sich auch bei Meerschweinchen C, trotz der vorhergegangenen Typhusinfektionen.

Am 14. November war die Agglutination bereits bei einer Verdünnung von 1 : 300 sichtbar, doch waren die Häufchen klein (4') und viele Bacillen blieben frei. Die gleichen Ergebnisse erhielt ich am 19. Am 20. fand die Agglutination bei einer Verdünnung von 1 : 500, wenn auch schwach, statt; am 22. fand sie bei 1 : 2000 statt und erhielt sich eine ziemlich lange Zeit auf dieser Höhe. Bei dieser Verdünnung waren die Häufchen klein (4'), aber zahlreich; ein größerer Teil der Bacillen erhielt sich frei (5'). Bei 1 : 1500 sind die Häufchen schon nach 3 Stunden etwas umfangreicher, nach 1 Tage noch mehr, etwa die Hälfte der Bacillen bleibt frei. Bei 1 : 500 findet man mittlere Häufchen (2'), die im Laufe eines Tages anwachsen; nach 3 Stunden sind etwas wenige Bacillen frei (2'), deren Menge nach 1 Tage vergrößert ist (3—4'). Bei 1 : 250 treten große Haufen auf, die Bacillen sind nach 3 Stunden völlig unbeweglich und nur ganz vereinzelt isoliert; nach 1 Tage sind sehr wenige beweglich (2').

Die Agglutinationsfähigkeit ändert sich in der Folge wenig. Am 20. Dezember, also nach 1 Monate, ist sie noch ziemlich stark ausgeprägt; man findet bei einer Verdünnung von 1 : 250 nach 3—5 Stunden große Haufen, einige freie, aber ganz unbewegliche Bacillen; nach 1 Tage sind die Haufen größer geworden, aber es zeigt sich eine bestimmte Zahl beweglicher Bacillen. Die Agglutination bei 1 : 1500 ist schwach, aber deutlich sichtbar. Bei 1 : 2000 zeigt sich lediglich das Bestreben der Agglutination; bei 1 : 2500 fehlt auch dieses.

Ich wollte nun feststellen, wie sich ein Meerschweinchen, das noch keine vorausgegangene Injektion von Typhus erhalten hat, gegenüber dem Coli verhält. Ein Meerschweinchen, 282 g schwer, welches ich mit E bezeichne, zeigte keine agglutinierende Wirkung gegenüber Coli; am 11. Dezember erhielt es eine Injektion von 1 ccm von der gleichen Emulsion, welche dem Meerschweinchen C eingeimpft worden war. Am 16. war sein Gewicht auf 245 g zurückgegangen, am 17. verendete es. — Es war also eine 5mal kleinere Dosis von der gleichen Kultur, die ohne Schaden auf das Meerschweinchen C überimpft werden konnte, hinreichend, ein frisches Meerschweinchen zu töten. Es ist übrigens eine schon bekannte, durch Sanarelli entdeckte Thatsache, daß Typhus gegen Coli immunisieren kann und umgekehrt. — Bei der Autopsie findet man keine makroskopisch sichtbare Veränderung; die Gewebe sind steril. Das Serum besitzt in geringem Grade agglutinierende Fähigkeit; bei einer Verdünnung von 1 : 100 findet man nur das Bestreben der Agglutination; bei 1 : 50 erblickt man nur sehr kleine Häufchen, der größte Teil der Bacillen bleibt beweglich; erst bei 1 : 25 findet eine ausgesprochene Agglutination statt, jedoch sind die Häufchen immer klein (4') und mehr als die Hälfte der Bacillen behält ihre Beweglichkeit. Die nach 1 Tage gemachten Beobachtungen sind von denen nach 2—4 Stunden wenig verschieden.

Am 2. Januar erhielt ein mit E' bezeichnetes Meerschweinchen, dessen Serum keine Wirkung auf Coli und Typhus ausübte, eine Injektion von $^1/_2$ g der nämlichen Lösung. Das Gewicht des Tieres, das zuerst 340 g betrug, sank schnell; am 6. betrug es nur noch 275 g, am 10. 235 g, worauf ich das fast sterbende Tier tötete. Bei der Autopsie zeigte sich keine sichtbare Veränderung. Das Serum war so wenig agglutinierend wie im vorhergehenden Falle; bei 1 : 100 Bestreben zur Agglutination; bei 1 : 30 blieb der größte Teil der Bacillen beweglich nach 3 Stunden sowohl als nach 1 Tage, doch bemerkte man mittlere Häufchen. In der Verdünnung von 1 : 10 zeigte das Serum des Tieres eine schwach agglutinierende Wirkung auf Typhusbacillen (4', 5'), die noch bei 1 : 20 sichtbar war.

Man sieht demnach, daß die vorangegangenen Impfungen mit Typhus die Erscheinung einer viel stärkeren Agglutinationsfähigkeit gegenüber dem Coli zu verleihen scheinen, als wie sie bei einer Impfung mit Coli allein stattfinden, selbst in dem Falle, wo letzteres imstande ist, den Tod des Tieres zu veranlassen. Nichtsdestoweniger ist ein Einwurf gegen diese Untersuchungen möglich. Man kann anführen, daß Meerschweinchen C eine stärkere Agglutinationsfähigkeit gegenüber dem Coli erhalten hat als die beiden anderen E und E', weil ihm eine vielmal größere Menge von Coli eingeimpft wurde; deshalb erwies sich die Reaktion als eine deutlichere. Aber ich werde berichten, daß auch andere Autoren gefunden haben, daß es schwierig sei, mit Meerschweinchen eine Agglutination auf Coli zu erhalten. Bensaude[1]) sagt: „Le sérum des cobayes infectés avec le coli-bacille n'acquiert que difficilement la propriété d'agglutiner ce bacille ...... le sérum des cobayes est resté inactif même vis-à-vis de l'échantillon qui avait servi à injécter ces animaux, et cela après 2, 4 et même 8 inoculations." Fodor und Riegler[2]) fanden eher die Pseudoagglutination als die wirkliche; sie

1) Le phénomène de l'agglutination. Paris 1897. Citiert von Rothberger.
2) Centralbl. f. Bakt. etc. Abt. I. Bd. XXIII.

blieb noch bei einer Konzentration von 1:50 gering. Sidney-Wolf[1]) hat Agglutination erhalten, er sagt jedoch nicht, mit welchen Verdünnungen. Selbst was die Wirkung des Coli auf andere Tiere anbetrifft, sind die Ergebnisse atypisch (Rothberger[2]), Radziewski[3]), Jatta[4]) etc.). Bei Menschen fanden Widal und Sicard[5]) in 20 Fällen von Coli-Bacillose eine gewöhnliche, ziemlich zweifelhafte Wirkung; sie sagen: „Les amas nous ont paru plus nombreux et plus volumineux qu'à l'ordinaire"; und analoge Resultate erhielten auch andere Beobachter. Nur in gewissen Fällen fand man aus unbekannten Gründen eine stärkere Agglutination bis zu einer Verdünnung von 1 : 12000; diese Wirkung ist hauptsächlich in Typhusfällen beobachtet worden [Gruber und Durham[6]), Biberstein[7]), Jahoston[8]) etc.]. In diesen Fällen war natürlich eine Vereinigung von Typhus und Coli anzunehmen. Meine Untersuchungen scheinen ein gewisses Licht auf diese Frage zu werfen; sie scheinen zu beweisen, daß Coli an sich unfähig ist, eine deutliche Agglutinationswirkung zu erzeugen; eine solche hat aber dann statt, wenn der Coli-Infektion eine solche von Typhus vorausgegangen ist oder sie begleitet.

Um den angedeuteten Irrtümern in dieser Richtung vorzubeugen, wollte ich ein neues Meerschweinchen und ein schon einmal mit Typhus geimpftes mit völlig gleichen Mengen von Coli impfen und sehen, welche Ergebnisse ich dann erhielt.

Ein 350 g schweres Meerschweinchen F ohne Wirkung auf Coli und Typhus empfing am 12. Dezember 4 ccm einer sterilisierten Typhuskultur und am 28. gleichen Monats noch weitere 5 ccm. Das Serum zeigte für Typhus am 10. Januar eine sehr schwache Agglutination bei 1:1500; die Häufchen waren klein (4'), die Mehrzahl der Bacillen beweglich, besonders nach 1 Tage. Bei 1 : 250 war die Agglutination ziemlich deutlich, es bildeten sich nach 2 Stunden mittlere Häufchen (3') und ein Teil der Bacillen war beweglich (3'), nach 8 Stunden fand sich fast die Hälfte in Bewegung, nach 1 Tage noch mehr. Bei 1 : 25 und 1:50 entstanden nach 3 Stunden große Häufchen (1—2') netzförmig, bei 1 : 25 sehr kompakt, bei 1 : 50 weniger. In beiden Fällen konnte man nur wenige bewegliche Bacillen bemerken. Nach 1 Tage waren die Häufchen sehr kompakt, ebenso zeigte sich eine kleine, bei 1 : 50 etwas größere Zahl beweglicher Bakterien. Auf Coli fand bei 1 : 10 keine Wirkung statt.

Dieses Meerschweinchen und ein anderes frisches, mit F' bezeichnet, das 310 g wog und gleichfalls weder auf Coli noch auf Typhus wirkte, erhielt nach und nach:

Am 10. Januar	0,75 ccm		
„ 22. „	1,0 „		
„ 27. „	2,0 „	}	der gleichen Coli-Emulsion
„ 31. „	3,0 „		
„ 4. Februar	3,0 „		

1) Centralbl. f. Bakt. etc. Abt. I. Bd. XXIV.
2) Zeitschr. f. Hygiene. Bd. XXXIV.
3) Zeitschr. f. Hygiene. Bd. XXXIV.
4) Zeitschr. f. Hygiene. Bd. XXXIII.
5) Citiert von Pfaundler, Centralbl. f. Bakt. etc. Abt. I. Bd. XXIII.
6) Münch. med. Wochenschr. 1896.
7) Zeitschr. f. Hygiene. Bd. XXVII.
8) Citiert nach Savage, The Lancet. 1900.

Da das Meerschweinchen F auf Typhus keine genügend starke Agglutination ausübte, impfte ich ihm, um dieselbe zu vergrößern, am 27. und am 31. Januar 1—2 ccm einer sterilisierten Typhusemulsion ein.

Am 30. Januar fehlte bei F' jede Agglutination auf Coli, bei F fand eine ziemlich schwache statt (4', 5'). Am 3. Februar war auch bei F' eine Agglutination (bei 1 : 25); sie war sehr schwach, kleine Häufchen, Bewegung der Mehrzahl der Bacillen sowohl nach 2—3 Stunden als nach 1 Tage; bei 1 : 50 zeigte sich eine zweifelhafte Tendenz zur Häufchenbildung; bei 1 : 100 fehlte jedes Anzeichen einer Agglutination. Dagegen war die Agglutination von Meerschweinchen F sehr kräftig bei einer Konzentration des Serums von 1:25; es entstanden größere Häufchen (2—3), nach 3 Stunden blieben sehr wenig Bacillen beweglich (2'), nach 24 Stunden zeigte eine etwas größere Zahl Bewegung (3'). Bei 1 : 100 sieht man noch eine genügend markante Reaktion, mittlere Haufen (3—4') und einige kleinere; mehr als die Hälfte der Bacillen behält Bewegung. Bei 1 : 250 findet man noch nicht sehr zahlreiche kleine Häufchen (4') und die meisten Bakterien beweglich.

Meerschweinchen F' läßt auch eine schwache agglutinierende Wirkung auf Typhus bei Verdünnung 1 : 10 erkennen (4', 5'); bei 1 : 25 ist sie noch schwach sichtbar. Meerschweinchen F besitzt eine vergrößerte Wirsamkeit auf Typhus in deutlicher Form; doch habe ich dieselbe nicht genauer bestimmt; ich habe mir vorgenommen, dies später zu thun, hatte aber dazu keine Gelegenheit mehr.

Die relativen Ergebnisse mit Coli schließen demnach gut an die der vorher berichteten Fälle. Ich glaube somit einen allgemeinen Schluß ziehen zu dürfen:

Es ist möglich, die Thätigkeit des Organismus gegenüber einem pathogenen Mikroorganismus durch die vorausgegangene Impfung mit einem anderen zu vermehren.

Für die Beobachtung der Agglutination des Typhus habe ich das Meerschweinchen D benutzt und dessen und des Meerschweinchens C Verhalten untersucht.

Bis zum 22. November zeigte sich in der Agglutination keine Veränderung gegenüber früher und keine Verschiedenheit bei den beiden Versuchstieren. Am 27. fehlte bei der Kontrolle von D bei einer Verdünnung 1 : 10000 die Agglutination völlig nach 3 Stunden, und war nach 24 Stunden zweifelhaft; bei 1 : 6000 war sie schwach (4'); sehr viele Bacillen blieben beweglich in beiden Fällen. Es fand also eine kleine Herabminderung der agglutinierenden Kraft statt; dies läßt sich dem Umstand zuschreiben, daß sich diese Kraft im Laufe der Zeit abschwächt. — Bei Meerschweinchen C war aber diese Abschwächung nicht zu beobachten, die Agglutination war noch bei 1 : 10000 deutlich sichtbar und bei 1 : 6000 konnte man Häufchen von mittlerer Größe (3') erkennen. Am 2. Dezember fehlte für D bei 1 : 10000, selbst nach 24 Stunden, jede Agglutination. Am 13. Dez. blieb sie für C noch unverändert, während sie für D auch bei 1 : 6000 ausblieb. Am 27. Dezember lieferte C bei einer Verdünnung von 1:250 ziemlich große Haufen und alle Bacillen waren nach 3 Stunden ohne Bewegung, D ließ bei der gleichen Verdünnung noch bewegliche Bacillen erkennen und gab mittlere Häufchen. Bei 1:1000 fanden sich bei C vereinzelte größere Haufen (2—3') und sehr wenig bewegliche Bacillen (1'), bei D zahlreiche mittelgroße Haufen und eine mäßige Zahl beweglicher Formen (3'). Bei 1:2000 für C mittlere Häufchen (3') und wenig bewegliche Bacillen (2').

für D kleine Haufen (4') und eine ziemliche Anzahl freier Bacillen, von denen viele beweglich waren (3—4'). Für C fand bei 1:3000 noch eine ziemlich starke Agglutination statt, während sie für D bei dieser Verdünnung spät eintritt und ihre Grenze erreicht hat. Bei 1 : 6000 und 1:10000 zeigt nur C eine agglutinierende Wirkung. Nach 24 Stunden sind die Ergebnisse annähernd die gleichen, abgesehen davon, daß eine mehr oder weniger große Zahl von Formen in allen Präparaten beweglich ist.

Am 2. Januar erhielt ich mit C dieselben Resultate; mit D zeigte sich bei 1:3000 eine zweifelhafte Agglutination, aber bei 1:2000 war sie noch ziemlich deutlich vorhanden. Mit am 8. Januar entnommenem Serum fand ich, daß Meerscheinchen C seine agglutinierende Wirkung, die es für Typhus beim Beginne der Coli-Injektionen besessen hatte, unverändert beibehalten hatte; diese Wirkung ist schwach, jedoch noch deutlich bei 1 : 10000, und man kann diese Verdünnung als die obere Grenze ansehen; die beweglichen Bacillen sind zahlreich, aber die Zahl der kleinen Häufchen ist bedeutend. Bei 1:250 sind die Bacillen unbeweglich und die Häufchen von ansehnlicher Größe. Meerschweinchen D zeigt dagegen eine sehr erhebliche Verminderung seiner agglutinierenden Kraft; sie fehlt nicht nur gänzlich bei 1 : 10000, sondern auch bei 1:6000, 1:3000 und 1:2000; bei 1:1500 erst erblickt man sehr kleine Häufchen, so daß diese Verdünnung die obere Grenze bedingt; noch bei 1 : 250 findet sich eine große Zahl freier Bacillen, selbst nach 2—4 Stunden.

Man kann allerdings aus diesem einzigen Experiment nicht mit großer Sicherheit ableiten. Aber es scheint doch zu beweisen, daß die Einführung eines Bakteriums die einmal vom Organismus erworbene Kraft, gegen ein Bakterium einer anderen Art zu wirken, dauernder erhalten kann. Es scheinen in der That die Coli-Injektionen bewirkt zu haben, daß die Abnahme der bereits gegenüber dem Typhus erzeugten agglutinierenden Wirkung schwieriger und langsamer erfolgt.

Im Besitze eines Serums, das sowohl gegenüber Typhus als Coli eine starke Wirkung ausübte, wollte ich untersuchen, ob die gleichen Substanzen, die die Agglutination des einen dieser Bacillen veranlaßten, auch bei der Agglutination des anderen teilnehmen. Um diese Frage zu ergründen, dachte ich das Serum zuerst auf einen der beiden Bacillen wirken zu lassen, und dann zu sehen, ob es noch fähig sei, auf den anderen zu wirken.

Ich glaubte anfangs mit getöteten Bacillen arbeiten zu müssen, weil die lebenden Mikroorganismen durch ihren Stoffwechsel die Zusammensetzung des Mittels verändern könnten, indem sie die die Bacillen der anderen Art agglutinierenden Substanzen assimilieren und zerstören können. — Ich habe daher eine sehr konzentrierte Emulsion von abgetöteten und gewaschenen Typhusbacillen in einer physiologischen Lösung hergestellt. Ich versicherte mich, daß die so behandelten Bacillen ebenso und durch die gleichen Lösungen agglutiniert wurden wie die lebenden. In Wirklichkeit vollzieht sich die Agglutination etwas langsamer, und die Bacillen sind weniger stark zusammengedrängt als in den mit lebenden gemachten Kontrollpräparaten, doch sind die Unterschiede nicht bedeutend. Zu einem Tropfen Serum fügte ich 15 Tropfen einer solchen Emulsion hinzu; nach einiger Zeit war die Lösung völlig klar geworden, aber ich centrifugierte sie, um die oben schwimmenden

Bacillen besser von der Flüssigkeit zu trennen. Zu 10 Tropfen derselben fügte ich noch 20 Tropfen der Emulsion; nach 1 Stunde blieb das Präparat noch trüb, trotzdem sah man mit dem Mikroskope Häufchen; ich centrifugierte nochmals und vermengte wieder 10 Tropfen dieser Flüssigkeit mit 20 der Emulsion. Da sich die Erscheinung der Agglutination, besonders in den ersten 24 Stunden, vergrößerte, dachte ich, daß sich vielleicht die Vereinigung der Bacillen mit der agglutinierenden Substanz langsam vollziehe; ich ließ daher dieses Präparat bis zum folgenden Tage im Eisschranke stehen. Tags darauf überzeugte ich mich, daß es keine Häufchen mehr enthielt; in einem an einem früheren Tage gemachten Kontrollpräparate fehlten sie gleichfalls. Die Mikroorganismen hatten also die Lösung ihrer agglutinierenden Eigenschaften beraubt.

Ich glaube, daß alle diese Manipulationen notwendig waren, um sich zu versichern, daß die Typhusbacillen agglutinierende Wirkung aus der Flüssigkeit verschwunden ist. Von dieser Thatsache überzeugt, centrifugierte ich nochmals. Der klare Teil enthielt noch eine kleine Zahl isolierter Typhusbacillen. — Zu einem Teile dieser Flüssigkeit fügte ich nun zwei Teile einer Emulsion von Coli, und ich bemerkte, daß sich die Agglutination ziemlich gut vollzog; sie war nur ein wenig schwächer als in frischem Serum, was man vielleicht den Veränderungen zuschreiben kann, die bei den beschriebenen Manipulationen entstanden sind.

Ich wiederholte dieses Experiment mit einigen Abänderungen, aber immer mit dem nämlichen Resultate. Ein Kontrollversuch, den ich mit lebenden Typhusbacillen anstellte, ergab ein identisches Resultat; in diesem Falle zeigen die Typhusbacillen vor der letzten Centrifugation lebhafte Bewegung und sind stark isoliert.

Ich machte keine quantitativen Versuche mit dem Meerschweinchen C; ich wollte später dieselben mit dem Meerschweinchen F machen, nachdem ich ihm eine starke agglutinierende Kraft gegen Coli und Typhus verliehen hatte, aber wie schon gesagt, mußte ich diese Arbeit unterbrechen und auf diesen Versuch verzichten.

Indessen glaube ich, aus diesen Beobachtungen schließen zu dürfen, daß die das Bact. coli commune agglutinierende Substanz des Meerschweinchens verschieden von der das Bact. typhi agglutinierenden desselben Tieres ist.

Diese Ergebnisse scheinen von vornherein mit der Theorie der Seitenketten Ehrlich's übereinzustimmen. Dieser Gelehrte giebt an, daß ein Tier imstande sei, eine beträchtliche Zahl von verschiedenen gegen die Bakterien- oder tierischen Zellen oder gegen toxische Stoffe gerichteten Substanzen (Receptoren verschiedener Ordnung) hervorzubringen. Hier haben wir in Wirklichkeit gesehen, daß die Agglutinine des Coli und des Typhus, die im Serum des Meerschweinchens enthalten sind, zwei verschiedene Substanzen sind.

Aber wenn es einen Fall giebt, in dem dieses Prinzip von Ehrlich nicht zutreffen sollte, ist es der eben erwähnte. Wir haben gesehen, daß ein gegen Typhus immunes Meerschweinchen gegen Coli immun ist und es eine viel größere Dosis von jenen ertragen kann als die tödliche Dosis; also immunisieren die gleichen in dem Tiere vorhandenen Substanzen sowohl gegen Typhus als auch gegen Coli. Aber die Ehrlich'sche Theorie giebt an, daß es, um ein gegen ein Zellenelement oder eine chemische Substanz wirksames Serum zu erzielen,

notwendig sei, daß gerade diese zuerst eine Wirkung auf die Zellen des Organismus ausüben, indem sie teilweise die Ernährung derselben hemmen; sie setzen sich in einer stabilen Art auf ihren Sammelplätzen fest und verhindern so die ernährenden Vorgänge, die hier im normalen Zustande ihren Sitz haben. Auf ihrem Wege reagieren nun die Zellen auf diese Einwirkung, indem sie diese Receptoren entweichen lassen, wodurch eine Ueberproduktion von freien Receptoren, die durch das Blut ihren Weg nehmen, stattfindet. — Aber wenn diese vorangegangene Einwirkung fehlt, wenn der Organismus geschützt ist, wenn er bereits, wie in unserem Falle, eine offenbare Immunität besitzt, kann der von der Ehrlich'schen Theorie angenommene Mechanismus, auf dem sie basiert, keine Rolle spielen; man darf nicht von einer neuen Erzeugung schützender Produkte sprechen. Wenigstens sollte man nicht eine höhere Agglutinationswirkung haben, als wenn man nur das Coli geimpft hat.

Es ist jedoch notwendig, sich der Thatsache zu erinnern, daß die Agglutinationswirkung nicht die einzige der vom Organismus gegen die pathogenen Erreger ausgeübten Thätigkeiten ist, und daß dies vielleicht keine wichtige Rolle beim Entstehen der Immunität spielt[1]). Aus den oben deduzierten gewichtigen Gründen kann man hier aus der Theorie Ehrlich's keine strengen Schlußfolgerungen ziehen.

Andererseits kann man die beobachteten Thatsachen auf eine ziemlich ungezwungene Weise erklären, so daß mehr Einklang mit dieser Theorie hergestellt wird.

Es ist zu erwähnen, daß die Coli-Receptoren sich ziemlich schwer von den sie erzeugenden Zellen trennen; Coli-Injektionen allein geben in der That zu einer starken Agglutination keine Veranlassung. Bei einer Impfung mit Typhusbacillen dagegen trennen sich die Typhusreceptoren in großer Zahl ab und verleihen dem Blutserum eine starke Agglutinationsfähigkeit. Nun wird durch diese Thätigkeit der Zellen auch die Absonderung von Coli-Receptoren erleichtert und eingeleitet. Daher zeigt sich nach Typhusinjektionen oft auch gegenüber Coli eine Agglutination: die den Zusammenhang der Coli-Receptoren mit den Zellen bedingenden Kräfte sind so gelockert, die Unstabilität dieser Elemente ist eine so große geworden auf Grund der vorangegangenen Absonderung der Typhusreceptoren, daß sich die Coli-Receptoren auch ohne eine Einwirkung von Coli freiwillig abtrennen, und somit gleichfalls in die Blutbahn gelangen. Diese Wirkung wird gegenseitig sein; wir haben in der That gesehen, daß zwei unserer nur mit Coli geimpften Meerschweinchen eine leichte agglutinierende Wirkung auch auf Typhus ausgeübt haben; und viele analoge Angaben finden sich in der Litteratur über die Frage der Agglutination.

Impft man unter diesen Umständen ein Meerschweinchen mit Coli, so sondern sich Coli-Receptoren, die diese bemerkenswerte Unstabilität erhalten hatten, mit ziemlicher Leichtigkeit ab. Zwei Erscheinungen wird dies zur Folge haben. Einerseits erleiden die sie produzierenden Zellen keine erhebliche Beschädigung; denn, indem sie ihre unthätig gewordenen Receptoren abgeben, welche ihre Ernährungsthätigkeit hindern oder hemmen, kann ihre Ernährung nicht mehr gefährdet sein. Dies kann die durch Typhusinjektionen erworbene Immunität gegen

---

1) Siehe Metschnikoff, Handb. d. Hyg., herausgeg. v. Th. Weyl, Artikel Immunität. p. 33 ff.

Coli hinreichend klären. Andererseits werden die Coli-Receptoren wegen ihrer nunmehrigen Unstabilität unter der Reizwirkung des Coli in großer Zahl das Blut durchsetzen, und damit ist die Entstehung einer vorher unmöglichen starken Agglutination zu erklären.

Die beobachteten Thatsachen finden dann durch diese Auffassung eine hinreichende Erklärung und stehen untereinander wohl im Einklange.

Aber warum erleichtert die Absonderung der Typhusreceptoren diejenigen der Coli-Receptoren? Man kann sich ähnliche Verhältnisse vorstellen wie in einem Molekül Chlorammonium, das nicht imstande ist, eines seiner Wasserstoffatome an Sauerstoff allein abzugeben, während dies stattfindet, wenn es sein Chloratom zugleich an Calcium abgiebt: der Austritt des Chloratoms vollzieht sich also leicht und bringt gleichzeitig den Verlust eines Wasserstoffatoms mit sich. Dieser Vergleich ist zwar ungenau, jedoch handelt es sich nur um eine ungefähre Analogie.

Um die oben ausgesprochenen Voraussetzungen mit Thatsachen zu begründen, wird es selbstverständlich nötig sein, noch weitere Versuche auszuführen. Z. B. wenn die Immunität, die durch Impfung mit Typhus allein gegenüber Coli erzeugt ist, wirklich von einer Aenderung in der Konstitution der Zellen (durch die Leichtigkeit die Receptoren abzugeben) eher als von einer neuen Zusammensetzung des Serums (durch dessen Gehalt von freien Receptoren) herrührt, muß sich das Serum dieser Tiere unfähig zeigen, eine Heilwirkung gegenüber experimentellem Coli zu entfalten, während, wie wir wissen, eine ziemlich offenkundige Wirkung gegen Typhus besteht. Andererseits haben wir beobachtet, daß mit Coli allein immunisierte Tiere häufig eine agglutinierende Wirkung auch auf Typhus zeigen: wenn diese Erscheinung wirklich durch die spezifischen Receptoren des Typhus hervorgerufen wird, die durch den von Coli hervorgebrachten Reiz abgesondert und in die Blutbahn gebracht worden sind, so muß der Coli außer stande sein, sie festzuhalten, und die einleitende Wirkung des Typhus würde die agglutinierende Wirkung gegenüber Coli nicht ändern. Man kann diese Experimente leicht erweitern und variieren; aber ich hatte keine Gelegenheit, mich mit ihnen zu befassen; ich hoffe, sie später wieder aufnehmen zu können.

Das Vorhandensein einer nur an die Leichtigkeit der Zellen, ihre Receptoren zu verlassen, gebundene Immunität dürfte auch erklären, daß die Menschen, welche einmal vom Typhus betroffen worden sind, die Immunität davor für ihr ganzes Leben bewahren können, trotzdem ihr Serum seine heilenden und agglutinierenden Eigenschaften mehr oder weniger schnell verliert.

Ich muß hier noch darauf aufmerksam machen, daß Malkoff[1]) und Neisser[2]) sich derselben Technik wie ich bedienten, um den Nachweis der Vielfältigkeit der agglutinierenden oder immunisierenden Substanzen der Normalsera zu leisten.

Am 20. Dezember wog Meerschweinchen C beinahe 430 g. Sein Gewicht hatte sich demnach nicht verringert. Sein Serum war ohne Wirkung auf Pyocyaneus in der Verdünnung 1:100 und 1:50; bei 1:20 erzeugte es eine leichte Agglutination (3, 5').

1) Deutsche med. Wochenschr. 1900.
2) Deutsche med. Wochenschr. 1900.

Am 20. Dezember erhielt dieses Tier 1 ccm einer Emulsion von Pyocyaneus, die während 30 Minuten bei 60° sterilisiert worden war. Es magerte stark ab und am 8. Januar wog es nunmehr 375 g; es bedurfte langer Zeit, um sich zu erholen. Um es nicht zu töten, wartete ich mit einer zweiten Injektion von 2 ccm bis zum 22. Januar; es wog damals 400 g. Am 29. Januar betrug sein Gewicht 385 g; am 30. Januar und am 4. Februar brachte ich ihm noch Injektionen von 3 ccm bei, auf die hin es nicht mehr erkrankte.

Ich bespreche zuerst die Veränderung, die dadurch in der Agglutination gegen den Coli hervorgerufen wurden.

Am 22. Dezember zeigte sich diese Agglutination gleich stark wie vor der Injektion. 5 Tage später, am 27., fand man bei einer Verdünnung von 1 : 250 nach 2 Stunden nur sehr kleine Häufchen und das Bestreben, größere zu bilden; die beweglichen Bacillen sind zahlreich; bei 1 : 500 fand man nur das Bestreben der Agglutination; bei 1 : 1000 konnte man nichts beobachten. Nach 3 Stunden bei 1 : 250 zeigten sich ein wenig größere Häufchen (3—4) und mehr als die Hälfte der Bacillen war beweglich; bei 1 : 500 waren die Häufchen sehr klein (2—3 Bacillen), die Agglutination war zweifelhaft, die Hälfte der Bacillen blieb beweglich; jede Agglutination fehlte bei 1 : 1000. Nach 24 Stunden war auch bei 1 : 250 die Mehrzahl der Bacillen beweglich.

Am 9. Januar fehlte eine Agglutination bei 1 : 1000 und 1 : 500; bei 1 : 250 zeigen sich auch nach 24 Stunden nur sehr kleine Häufchen; nach 3 Stunden ist mehr als die Hälfte der Bacillen beweglich, nach 24 Stunden beinahe alle. Die Agglutination ist ungewiß.

Am 18. Januar fehlte die Agglutination bei 1 : 250 und war sehr schwach bei 1 : 250 (4', 5'); bei 1 : 50 bleiben immer viel Bacillen beweglich. Die Resultate sind am 22. Januar dieselben.

Am 30. Januar endlich war auch bei 1 : 120 die Agglutination zweifelhaft, aber bei 1 : 100 noch vorhanden. Bei 1 : 25 gelang es im Verlaufe von 2—3 Stunden die Bacillen unbeweglich zu machen; die Häufchen sind mittelgroße.

Es ist nicht gestattet, auf Grund eines einzelnen Versuches allzu weitgehende Schlüsse zu ziehen. Demnach, da der Abfall der Agglutinationsfähigkeit ein so beträchtlicher und rapider nach der ersten Injektion von Pyocyaneus gewesen ist, kann man zugeben, daß die Injektion eines Mikroben die Abschwächung der agglutinierenden Kraft, die zuerst gegenüber einem anderen erworben worden war, zur Folge haben kann.

Diese Thatsache läßt sich unschwer mit der Theorie Ehrlich's erklären. Wir wissen, daß, nach Ehrlich, die Uebererzeugung der Receptoren eine Reaktion der Zellen gegen die auf sie ausgeübten Eingriffe ist. Wir kennen die wirklichen mechanischen Ursachen dieser Reaktion nicht, aber wir können die Thatsache annehmen. Die nämliche Zelle kann imstande sein, eine große Zahl verschiedener Receptoren zu erzeugen, aber es ist nicht gesagt, daß, wenn diese Ueberproduktion gleichzeitig stattfindet, sie ohne Gefahr für die Zelle sei und ihre Ernährung darunter nicht leide. Wir wissen, daß die Receptoren an der Ernährung teilnehmen; daher kann der Verlust einer großen Zahl derselben leicht Störungen in der Ernährung zur Folge haben. Wenn dies der Fall ist, wenn diese Ueberproduktion gefährlich wird oder Grund für eine Schwäche der Zellenelemente des Organismus bedeutet, so hören letztere fast notwendigerweise auf, mit der gleichen

Energie, alle die Receptoren zu erzeugen, die sie früher produzierten, um nunmehr nur eine einzige Art abzugeben.

Es ist noch hinzuzufügen, daß, wenn auch die Zellen sehr rasch ihre Fähigkeit, Receptoren zu erzeugen, einbüßen, diese Veränderung erst nach einigen Tagen im Serum sich zeigen muß, weil die Receptoren, die schon vorher vorhanden waren, nur langsam verschwinden können, indem sie durch den chemischen Prozeß im Organismus zerstört werden [1]).

Nach den Pyocyaneus-Injektionen erhielt sich die Agglutination des Meerschweinchens C gegen den Typhus für eine gewisse Zeit konstant; in der Folge wurde sie allmählich geringer, aber blieb stets höher als bei dem Tiere D.

Zum Beispiel am 3. Februar nach 3 Stunden entstanden sowohl bei C wie bei D mittlere Häufchen (3') mit 1 : 100, aber bei C kompaktere und größere; in beiden Fällen wurde die Hälfte der Bacillen frei. Mit 1:25 machte C die Bacillen fast vollständig unbeweglich (1'), D weniger gut (3'); C wirkte noch langsam bei 1 : 1000, D war ohne jede Wirkung. Der Unterschied ist nicht sehr stark, jedoch deutlich wahrnehmbar.

Was endlich die Agglutination von Pyocyaneus anbetrifft, beobachtete ich dieselbe zum erstenmal am 9. Januar. Mit 1 : 25 erhielt man nach 2 Stunden mittlere Häufchen (2'); bei 1 : 50 kleine Häufchen (4'); bei 1 : 100 konnte man keine starke Wirkung bemerken; es waren viele bewegliche Bacillen anwesend in allen 3 Fällen. Nach 1 Tage waren die Häufchen deutlicher geworden.

Am 3. Februar nach 3 Stunden war bei 1 : 25 starke Agglutination bemerkbar, sowie keine freien Formen; bei 1 : 100 sah man nur kleine Häufchen, aber keine beweglichen Bacillen, bei 1 : 250 und 1 : 1500 viele unbewegliche Formen. Nach 24 Stunden sah man, daß die Häufchen bei 1 : 25 sehr groß und kompakt geworden waren und daß keine beweglichen Individuen vorhanden waren; bei 1 : 100 mittlere Häufchen (3'), ziemlich kompakt, wenig bewegliche Bacillen (2'); bei 1 : 250 mittlere und kleine Häufchen (3—4) und wenig bewegliche Bacillen; bei 1 : 1500 waren die Bacillen durchweg gut beweglich und keine Agglutination vorhanden. — Ich habe das Serum nach der letzten Injektion von Pyocyaneus nicht mehr geprüft, aber die erhaltenen Resultate reichen aus, zu beweisen, daß dieses Tier agglutinierende Fähigkeit auf die 3 Mikroorganismen (Typhus, Coli, Pyocyaneus), mit denen es geimpft worden war, allmählich erworben hat und gleichzeitig besaß.

Das Meerschweinchen B erhielt am 27. November eine subkutane Injektion einer Emulsion von lebenden Coli, die auf die gleiche Weise wie die dem Tiere C eingeimpfte hergestellt worden war. Am 30. November morgens war das Tier tot. Die Autopsie ließ eine starke subkutane Infiltration erkennen; angelegte Kulturen offenbarten die Anwesenheit von reinem Coli. — Die erworbene Immunität gegenüber Coli ist also nicht imstande, den Tod bei einer Injektion mit einer ziemlich unbedeutenden Menge von lebendem Coli zu verhindern.

---

1) Anmerkung bei der Korrektur: Ein ähnliches Ergebnis wie das oben erwähnte ist von Ehrlich und Morgenroth (Berl. klin. Wochenschr. 1991. No. 10) erhalten worden; diese Autoren haben jedoch eine ganz andere Erklärung davon gegeben.

Am 21. November wog Meerschweinchen A 390 g, sein Gewicht ist also merklich gestiegen. Die Agglutination des Typhus vollzieht sich ganz gleich wie vorher; selbst bei 1:10000 ist sie noch etwas bemerkbar.

Am gleichen Tage überimpfte ich ihm 2 ccm einer bei 60°, während 30' sterilisierten Streptokokkenkultur in Bouillon, ziemlich virulent für die Kaninchen. Am 1. Dezember betrug das Gewicht 400 g, am 2. erhielt es noch eine Injektion von 2 ccm der gleichen Kultur, am 6. nochmals 2 ccm. Das Tier wog am 10. 410 g, am 11. machte ich wieder eine Injektion von 3 ccm. Am 14. betrug das Gewicht 415 g, aber das Tier war sehr krank und ich stellte die Injektion ein. In der Folge sank das Gewicht rapid; am 20. war es auf 388, am 6. Januar auf 335 und am 8., also fast einen Monat später, auf 330 g zurückgegangen.

Ich halte es für angezeigt, darauf hinzuweisen, daß man nicht immer ein großes Vertrauen auf die Bestimmungen des Gewichtes haben darf. Vor allem kann das gleiche Tier im Laufe eines Tages starke Schwankungen aufweisen, je nachdem es gefressen hat oder nicht; um mich von solchem Irrtum möglichst zu entziehen, führte ich die Wägungen stets zu den gleichen Stunden aus. Fernerhin kann es der Fall sein, daß ein Tier nach einer Injektion eines pathogenen Mikroorganismus (besonders wenn es ein Infiltration, Eiterung, Oedem hervorrufender ist) eine Vermehrung seines Gewichtes zeigt, die durch eine lokale Ansammlung einer Flüssigkeit hervorgebracht wird, obwohl der Organismus wirklich gefährdet ist, und daß dann diese Gefährdung erst später durch eine Gewichtsabnahme bemerkbar wird, wenn die Flüssigkeit resorbiert ist.

(Schluß folgt.)

Färbemethoden für Malariaparasiten.

[Aus dem Institut für Schiffs- und Tropenkrankheiten in Hamburg. (Leiter: Physikus Dr. Nocht).]

Von **G. Giemsa**, Assistenten am Institut.

Meinen Untersuchungen über einige für die Färbung von Malariaparasiten von verschiedenen Autoren empfohlene Farbgemische, deren Resultat ich im Februar d. J.[1]) in einer vorläufigen Mitteilung veröffentlichte, lag das Bestreben zu Grunde, die mannigfachen, hinsichtlich ihrer Brauchbarkeit teilweise sehr viel zu wünschen übrig lassenden Methoden durch eine möglichst einfache, einheitliche und zuverlässige zu ersetzen. Hierdurch sollte es gelingen, auch die auf entlegeneren tropischen Stationen thätigen, nur mit den allernotwendigsten wissenschaftlichen Hilfsmitteln ausgerüsteten Aerzte in die Lage zu versetzen, sich wirklich praktisch mit der Romanowsky'schen Blutfärbung beschäftigen zu können.

Bevor dieses Ziel erreicht werden konnte, schien es mir das erste Erfordernis, die Zersetzungsprodukte des mit Alkalien behandelten

1) Giemsa, G., Färbemethoden für Malariaparasiten. (Diese Zeitschrift. Abt. I. Orig. Bd. XXXI. p. 429.) [Vorl. Mitt.]

Methylenblaus bezüglich ihrer färberischen Eigenschaften noch einmal genau zu studieren, da die verdienstvolle Arbeit von Michaelis[1]), welche zu dem Resultat führte, daß bei der Romanowsky-Färbung der Anwesenheit des Methylenazur die Chromatinfärbung zu verdanken, das Methylenviolett hingegen färberisch kaum in Betracht zu ziehen sei, durch Reuter[2]) angegriffen worden war, indem dieser erklärte, Michaelis schien dasjenige Zersetzungsprodukt entgangen zu sein, dessen Eosinverbindung R. isoliert und in ihrer Wirksamkeit erkannt habe. Desgleichen führt R. aus, könnte der Farbstoff, welchen M. als Methylenazur bezeichnet, aus gewissen Gründen nicht in Frage kommen.

Da von den Zersetzungsprodukten des Methylenblaus, von denen für uns nur das Methylenviolett und Methylenazur in Frage kommen können, zunächst keines im Handel zu haben war, schritt ich selbst zur Herstellung dieser beiden Körper, indem ich anfangs nach dem von Bernthsen[3]) angegebenen, sehr komplizierten Verfahren arbeitete. Die Ausbeute an reinem Violett war hierbei eine ziemlich reichliche, die an Azur, welches sich nur schwer reinigen ließ, hingegen eine sehr geringe.

Inzwischen war es mir doch möglich geworden, eine Quantität Violett von der Badischen Anilin- und Sodafabrik zu erhalten, desgleichen hatten die Höchster Farbwerke in entgegenkommendster Weise das Azur anfertigen und mir zwei Proben desselben gratis zur Verfügung stellen lassen, von denen die eine mit Methylenazur pur., die andere mit Methylenazur crud. bezeichnet war. Von diesen 3 Farbstoffen verhielt sich das Methylenviolett, für sich allein angewendet, färberisch fast indifferent. Seine von mir hergestellte, gut krystallisierende Eosinverbindung gab (in Alkohol gelöst und darauf mit Wasser verdünnt zur Färbung benutzt) bei reichlich ausfallendem, vom Präparat nur schlecht abzuwaschenden Niederschlag selbst nach 24-stündiger Einwirkung nur Rotfärbung der eosinophilen Elemente, während irgend welche Färbung der Kerne nicht zu beobachten war. Auch mit dem Azur crud., welches noch beträchtliche Mengen Violett aufwies[5]), konnten weder allein noch in Verbindung mit Eosin nennenswerte Resultate erzielt werden.

Anders verhielt sich hingegen eine Färbung mit einer Lösung des Höchster Azur pur. Für sich allein angewendet färbte, sie Malariablut schnell und ähnlich wie eine alt gewordene Manson-Lösung, im Verein mit Eosin zeigte sie das überraschende Gesamtbild einer ausgesprochenen Romanowsky-Färbung.

Indessen schien mir dieser Versuch nicht ganz einwandfrei, da ich in dem Höchster Azur pur. noch deutliche Spuren Methylenblau nachweisen konnte[5]). Ich unterzog daher das Präparat unter Hinzufügung

1) Michaelis, L., Das Methylenblau und seine Zersetzungsprodukte. (Diese Zeitschr. Abt. I. Bd. XXIX. p. 763.)

2) Reuter, K., Diese Zeitschrift. Abt. I. Bd. XXX. p. 248.

3) Bernthsen, A., Studien in der Methylenblaugruppe. (Liebig's Annalen der Chemie Bd. CCXXX. p. 73.)

4) Michaelis, L. u. Wolff, A., Ueber Granula in Lymphocyten. (Virchow's Archiv f. pathol. Anat. Bd. CLXVII. p. 151.)

5) Es kann leicht zu Irrtümern führen, wenn man die Grün- bezw. Blaufärbung, welche verdünnte Methylenblau- und Methylenazur- bezw. Methylenviolettlösungen mit Schwefelsäure geben, wie Michaelis (1) vorschlägt, als Richtschnur bei der Beurteilung des quantitativen Verhältnisses des Blau bezw. Azur zum Violett in zersetzten Methylenblaulösungen verwertet. Die stark verdünnte Lösung des chemisch reinen

des von mir selbst hergestellten, gleichfalls noch schwach methylenblauhaltigen einer Reinigung, indem ich den Farbstoff in Wasser aufnahm, die Base vorsichtig durch sehr verdünnte Natronlauge ausfällte, mit Aether ausschüttelte, letzteren im Scheidetrichter trennte, nach Zusatz von etwas überschüssigem Salzsäurealkohol verdunstete, das wieder in Wasser aufgenommene Azurchlorhydrat durch Aussalzen, Abfiltrieren und Nachwaschen mit gesättigter Kochsalzlösung von der überschüssigen Salzsäure befreite, gut trocknete und schließlich in absolutem Alkohol aufnahm, aus welchem es sich nach mehrmaligem Umkrystallisieren beim vorsichtigen Verdunsten in wohlausgeprägten einheitlichen nadelförmigen Krystallen ausschied.

Sowohl die Analyse als auch die chemischen Reaktionen des über Schwefelsäure getrockneten Präparates sprachen dafür, daß ich es jetzt mit dem chemisch reinen Präparat zu thun hatte. Eine Färbung von Malariablut hiermit + Eosin bewies nunmehr, daß thatsächlich schon das reine Azur-Eosin imstande war, eine ausgeprägte Romanowsky-Färbung mit allen ihren Feinheiten zu liefern, wobei nur auffiel, daß das Blau in den mit ihm gefärbten Präparaten teilweise einen mehr ins Graue gehenden Farbenton angenommen hatte. Gegenüber der Färbung mit den sonst gebräuchlichen Farbgemischen bot sich hier die Annehmlichkeit, daß man in der Farbflotte, sofern etwas Azur im Ueberschuß war, noch lange Zeit hindurch immer wieder neue Präparate färben konnte und daß sich der Niederschlag vom Präparat durch Wasser sehr leicht entfernen ließ.

Um zu erproben, wie sich die Färbung bei gleichzeitiger Anwesenheit von Methylenblau gestaltete, wurden gleichstarke Lösungen dieser beiden Farbstoffe miteinander in den verschiedensten Verhältnissen gemischt und nach Hinzufügen von Eosin in Anwendung gebracht. Es stellte sich nun heraus, daß einige solcher Mischungen, insbesondere die von gleichen Teilen Blau und Azur, insofern sehr brauchbare Färbungen gaben, als die blaugefärbten Teile — bis auf die durch Metachromasie gekennzeichneten Partieen — denselben für die Differenzierung sehr vorteilhaften reinblauen Ton aufwiesen, wie man ihn bei der Färbung mit reinem Methylenblau-Eosin erzielt, während andererseits das Azur noch in völlig genügender Menge vorhanden war, um die Chromatinfärbung scharf zum Ausdruck zu bringen [1]). Der Niederschlag fiel hierbei etwas reichlicher aus, ließ sich indessen durch Wasser ebenfalls leicht abspülen.

Azurs giebt mit dieser Säure nämlich eine Grünfärbung mit solch starkem Stich ins Gelbliche, daß — wie ich bei Versuchen mit den chemisch reinen Farbstoffen beobachten konnte — 40 Proz. Violett und noch mehr anwesend sein können, ohne daß die durch Vereinigung des Gelb und Blau entstandene Grünfärbung einem ausgesprochenen Blau weicht. Etwas geeigneter, allerdings nur für eine schnelle oberflächliche Orientierung, erscheint es mir, die sehr stark verdünnten Lösungen im Reagenzglas mit wenig fixem Alkali zu versetzen und sofort kräftig mit Aether durchzuschütteln. Ist von den Zersetzungsprodukten nur Azur anwesend, so färbt sich der Aether rein hellscharlachrot. Ist gleichzeitig auch Violett vorhanden, so nimmt derselbe eine mehr oder weniger, bei Abwesenheit von Azur rein violette Farbe an. (Ebenso hergestellte Proben mit den chemisch reinen Farbstoffen bezw. Mischungen derselben müssen dem noch nicht Geübten hierbei stets zum Vergleich dienen!) Ist noch unzersetztes Methylenblau anwesend, so bleibt die untere Flüssigkeit hierbei blau, wogegen sie sich im umgekehrten Falle vollkommen entfärbt. Man ist somit auf diese Weise imstande, die Farblösung gleichzeitig auf alle drei Farbstoffe prüfen zu können.

1) Es wurde für sämtliche im Verlauf der Arbeit vorgenommene Färbungen völlig gleich behandeltes Material derselben Blutentnahme verwandt.

War Methylenblau in größerem Ueberschuß zugesetzt, so trat die Chromatinfärbung gar nicht mehr oder nur sehr spät ein.

Das Hinzufügen von Violett zu diesen Gemischen, welche hierdurch den für die Romanowsky-Färbung bisher empfohlenen Farbgemischen mehr oder weniger ähnlich wurden, hatte nur den vorauszusehenden Nachteil, daß die Färbung verzögert und hierdurch sowie durch den reichlicher ausfallenden, vom Präparat nur schwer zu entfernenden Niederschlag verschlechtert wurde.

Auf Grund dieser Thatsachen und der Wahrnehmung, daß sich das Methylenviolett in den nach den bekannten Methoden durch Alkalien zersetzten Methylenblaulösungen immer in größeren Mengen bildet (das Nocht'sche „Rot aus Methylenblau“ ist eine Lösung der Methylenviolett- und Methylenazurbase) und aus ihnen selbst durch komplizierte chemische Prozeduren kaum entfernt werden kann, machte ich mir die Herstellung des reinen Azurs nach einer möglichst einfachen Methode zur Aufgabe, wodurch es möglich werden sollte, den bisherigen Preis[1]) des Präparates annehmbar zu gestalten, denn es lag auf der Hand, daß man nur im Besitz des reinen Azurs in Form fester Substanz in der Lage sein konnte, die Brauchbarkeit und gleichmäßige Beschaffenheit der Farblösung in der Hand zu haben.

Nach vielen, teilweise vergeblichen Versuchen sind meine Bemühungen schließlich erfolgreich gewesen und die Firma Dr. Grübler & Hollborn in Leipzig, Bayerische Straße 63, welche die Herstellung des Farbstoffes nach meinem Verfahren übernommen hat, ist jetzt in der Lage, das Methylenazur zu einem wohlfeileren Preise abzugeben[2]).

Da das Azurchlorhydrat, das Sulfon des Methylenblaus wie dieses als trockene Substanz von außerordentlicher Haltbarkeit ist, desgleichen bei dessen neutralen, in ziemlicher Verdünnung (0,8 $^0/_{00}$) zur Anwendung kommenden Lösungen nach Monaten keinerlei nachteilige Veränderung nachgewiesen werden konnten, trotzdem dieselben — allerdings in braunen Flaschen — bei erhöhter Zimmertemperatur gestanden hatten und so oft sich Gelegenheit bot, absichtlich der direkten Sonnenstrahlung ausgesetzt wurden, ergiebt sich die Brauchbarkeit derselben auch für tropische Gegenden von selbst.

Auf die immerhin noch ziemlich komplizierte Bereitungsweise des reinen Azurs hier näher einzugehen, halte ich für unangebracht, weil sie als eine Frage rein chemischer Natur den Rahmen dieser Arbeit überschreiten würde.

Wie die Praxis gelehrt hat, verfährt man bei der Färbung am bequemsten und sparsamsten folgendermaßen: Man stellt sich je nach Bedarf eine beliebige Menge einer 0,8 $^0/_{00}$ wässerigen Lösung des Azur II[3]) her, ebenso hält man sich eine größere Menge einer 0,05 $^0/_{00}$ wässrigen Eosinlösung[4]) (Eosin Höchst extra wasserlöslich) in dunklen Gefäßen vorrätig. (Zur Lösung benutze man destilliertes oder sehr sauber aufgefangenes Regenwasser!)

---

1) Cfr. 1 (Anm. p. 307).

2) Genannte Firma giebt 1 g des für die Blutfärbung am meisten geeigneten Farbstoffes (Methylenazurchlorhydrat pur. + Methylenblau med. Höchst aa) unter dem Namen „Azur II zur Blutfärbung“ für 2,50 M., sowie 1 g des reinen Methylenarzurchlorhydrates unter dem Namen „Azur I (pur“) für 5 M. ab. Desgleichen werden dort Lösungen dieser Farbstoffe (0,8 $^0/_{00}$) vorrätig gehalten.

3) Kommt es lediglich auf eine ganz besonders stark ausgeprägte Chromatinfärbung an, so benutzt man natürlich vorteilhafter Azur I (pur.).

4) 5 ccm einer 1-proz. Eosinlösung auf 1 l Wasser.

Zur Herstellung der Farbmischung hat man jedesmal nur in ein graduiertes, genügend weites Reagierglas 10 ccm[1]) der Eosinlösung zu gießen und aus einer ebenfalls graduierten Farbpipette[2]) 1 ccm der Azurlösung zufließen zu lassen, umzuschütteln und die mit der bestrichenen Seite nach unten in Farbklötzchen liegenden alkoholgehärteten Präparate zu übergießen.

Nach 15—30 Minuten[3]) ist die Färbung beendet. Man spült 5—10 Sekunden in scharfem Wasserstrahl ab und untersucht, wenn man keinen säurefreien Kanadabalsam zur Verfügung hat, zunächst in Wasser. Die freie Säure schädigt nämlich die Chromatinfärbung meist fast augenblicklich und bringt sie schließlich — namentlich kann man dies bei Dauerpräparaten beobachten — ganz zum Verschwinden[4]). Desgleichen hat man sich beim Trocknen der gefärbten Präparate über der Flamme sehr vorzusehen und dasselbe lieber an der Luft vorzunehmen, da die Chromatinfärbung bei Temperaturen über 90° gleichfalls verschwindet. Ueberfärbungen treten selbst nach mehreren Stunden kaum ein. Sollten sie doch stattgefunden haben, so kann man das Präparat durch etwas längeres Abspülen im Wasserstrahl, Trocknen, einmaliges Durchziehen durch 96-proz. Alkohol und nochmaliges sofortiges Abtrocknen auf Fließpapier wieder brauchbar machen.

Da in der verwendeten Farbmischung das Verhältnis des Eosins zum Azur 5:8 im Verlaufe zahlreicher Versuche schließlich als das zweckmäßigste erkannnt wurde (cfr. [1]), den Molukulargewichten der betreffenden Farbsalze jedoch entsprechend

Eosinkalium $C_{20}H_6K_2Br_4O_5 + 5H_2O$ = 814
Methylenblauchlorhydrat $C_{16}H_{18}N_3SCl + 3H_2O$ = 378,5
Methylenazurchlorhydrat $C_{16}H_{18}N_3SO_2Cl$ = 351,5

in Anbetracht der zweibasischen Eosinsäure bei einem im stöchiometrischen Sinne genau abgesättigten Farbgemisch das Verhältnis sich 5:4,4 gestalten müßte, sehen wir, daß hier ein Ueberschuß des basischen Bestandteiles vorhanden ist, der, wie bei manchen anderen Färbemethoden auch hier von Vorteil ist. Bei Anwesenheit noch größerer Mengen der Farbbasen tritt indessen sehr leicht Ueberfärbung nach „Blau" ein (Violettfärbung der Erythrocyten).

Betrachten wir nun vergleichenderweise die außerordentlich mannigfachen, zur Färbung der Malariaparasiten empfohlenen eosinhaltigen Farbgemische, so sehen wir, daß der basische Betandteil ohne Ausnahme ein durch die verschiedensten Alkalien teils in der Hitze, teils bei mäßiger Wärme zersetztes Methylenblau bildet.

Die einschlägigen Arbeiten Bernthsen's (p. 308 Anm. 3) lehren jedoch, daß bei allen derartigen Prozessen neben unzersetztem Methylenblau unter Dimethylaminentwickelung in der Hauptsache Azur und Violett bezw. deren Leukoverbindungen entstehen, welche im quantitativen Verhältnis zu einander schon durch geringe (im Verlauf der [nach mancher Vorschrift tagelang dauernden] Zersetzung kaum zu vermeidenden) Temperaturschwankungen bedeutend differieren; Thatsachen, von denen ich

1) In meiner „Vorl. Mitteilung" (cfr. 1 p. 307) steht anstatt 10 ccm infolge Druckfehlers 19 ccm.

2) Beides bei Paul Altmann, Berlin N.W., Luisenstr. 57/63 zu haben.

3) Bei Verwendung concentrierterer Lösungen tritt die Färbung naturgemäß noch viel früher ein.

4) Säurefreien Kanadabalsam liefert auf besonderes Verlangen die Firma Dr. Grübler & Hollborn, Leipzig, Bayerische Straße 63.

mich durch mannigfache im Verlauf meiner Arbeit gemachte Versuche selbst überzeugen konnte.

Es liegt somit auf der Hand, daß eine gleichmäßig zusammengesetzte Farblösung auf diese Art und Weise ebensowenig wird erzielt werden können, wie es gelingen dürfte, aus ihr das die Färbung nachteilig beeinträchtigende Violett zu eliminieren und sich bei derartigen Lösungen von dem Verhältnis der drei Körper zu einander hinsichtlich ihrer Mengen eine Vorstellung machen zu können.

Es erhellt also, daß auch das jüngst von Reuter[1]) hergestellte A.-Methylenblau-Eosin kein einheitlicher in chemischem Sinne reiner Körper ist, sondern ein Farbgemisch der bereits in meiner früheren Mitteilung (p. 307 Anm.) angeführten Farbsalze; denn R. bedient sich für die Herstellung seines Präparates eines mit Natriumkarbonat zersetzten Methylenblaus, welches bei einer Temperatur zerlegt wird, bei der sich, wie ich durch eingehende Versuche[2]) (p. 308 Anm. 5) feststellen konnte, Violett in großen Mengen bildet.

Was die Anwendung des in Methylalkohol gelösten Reuter'schen Farbstoffes anbelangt, so konnten hier die guten Erfahrungen, die R. hiermit gemacht hat, nicht geteilt werden.

Wie sich trotz Anwendung reinsten und acetonfreien Holzgeistes aus der kalt bereiteten gesättigten Lösung selbst des reinen Azur-Eosins allmählich ein sehr schwer lösliches krystallinisches Farbsalz abscheidet — das ich aus verschiedenen Gründen als ein Kondensationsprodukt anzusehen geneigt bin — fallen mit der Zeit aus der in gleicher Weise bereiteten Lösung des Reuter'schen Farbstoffes Niederschläge in noch reichlicherem Maße aus, wodurch die Lösung dünner und schließlich — weil sie ja durch reichliche Aufnahme des färberisch indifferenten in Alkohol relativ leichtlöslichen Violett-Eosins von vornherein schwächer ist — gänzlich unbrauchbar wird.

Diesem Grunde sind wohl auch zum Teil die ungünstigen Erfahrungen zuzuschreiben, welche Panse[3]) kürzlich in Ostafrika mit dem Reuter'schen Farbstoff gemacht hat.

Mit Rücksicht hierauf sowie auf die Thatsache, daß der Methylalkohol eine Flüssigkeit ist, die schon bei 60° siedet und erfahrungsgemäß beim Transport und Lagern in den Tropen sehr schnell verdunstet, habe ich gänzlich davon abgesehen, das Azur-Eosin in methylalkoholischer Lösung zur Färbung zu empfehlen, obwohl die frischbereitete Lösung nach längerer Färbedauer sehr brauchbare Farberesultate liefert und sich — in dunklem Gefäß und bei kühler Temperatur aufbewahrt — immerhin einige Zeit hält.

Von Interesse dürften noch folgende, die Chromatinfärbung betreffenden Beobachtungen sein. Durch Versuche mit den reinen Spaltungsprodukten des Methylenblaus konnte zunächst bestätigt werden, daß die Behauptung von Michaelis, das Azur sei es, auf dessen Anwesenheit die fast spezifische Reaktion auf Chromatin bei der Romanowsky-Färbung beruhte, entgegen der Ansicht Reuter's ihre vollste Berechtigung hat.

Die von M. gemachte Beobachtung, daß die Kerne bei sehr langer Färbedauer bei reinem Azur auch ohne Zusatz von Eosin allmählich

---

1) Reuter, K., Diese Zeitschrift. Abt. I. Bd. XXX. p. 248.

2) Reduktion der Farblösung zur Leukoverbindung und Trennung der letzteren, beides nach Bernthsen (cfr. 3).

3) Panse, Diese Zeitschrift. Abt. I. Bd. XXX. p. 804.

rot werden, ist mir nie gelungen. Wohl nahmen sie einen violetten bis violettrötlichen Ton an, indessen war die für die Romanowsky-Färbung typische leuchtend rote Chromatinfärbung, wie man sie z. B. auch in sehr instruktiver, zur Unterscheidung von der mit reinem Azur sehr geeigneter Weise erhält, wenn man die zunächst nur mit Azur gefärbten Präparate kurze Zeit in ganz verdünnte (0,05 ‰) Eosinlösung taucht [1]), niemals eingetreten.

Ich stehe daher auf dem Standpunkte, daß das Eosin bezw. andere (siehe weiter unten) chemische Körper zum Hervorrufen dieser Reaktion neben Azur notwendig sind.

Inzwischen hat Nocht [2]) die interessante Beobachtung gemacht und mich mit der Veröffentlichung derselben betraut, daß nicht das Eosin (=Tetrabromfluoresceïn) als solches unbedingt zum Gelingen der Chromatinfärbung notwendig ist, sondern das schon der eine Komponent des Fluoresceïns, (Fluoresceïn = Resorcinphtalein), das Resorcin, desgleichen die beiden anderen Dioxybenzole, das Brenzkatechin sowie Hydrochinon dieselbe Rolle zu spielen imstande sind.

Vermutlich werden noch eine ganze Anzahl der in diese Reihe gehörenden Körper (Dioxytoluole etc.) und deren Derivate gleiche oder ähnliche Eigenschaften haben.

Bezugnehmend auf ein von Michaelis nach Erscheinen meiner ersten vorläufigen Mitteilung (p. 307 Anm.) an mich gerichtetes Schreiben, in welchem er unter Hinweis auf seine diesbezüglichen Arbeiten [3]) (p. 308 Anm. 4) bemerkt, daß auch ihm die Blaufärbung der Plasmodien- und Lymphocytenleiber durch Azur wohlbekannt gewesen wäre, will ich nicht zu erklären unterlassen, daß mir die unter 4 (p. 308 Anm.) bezeichnete, kurz vor der Drucklegung meiner vorläufigen Mitteilungen erschienene Arbeit noch nicht bekannt war. Nachdem ich die betreffende Publikation gelesen habe, erkenne ich die Berechtigung [4]) seiner Ausführung an [5]), und es freut mich um so mehr, die Resultate seiner letzten Forschung durch meine von ihm unabhängig und fast gleichzeitig mit absolut reinen Farbstoffen ausgeführten Untersuchungen nicht nur bestätigen zu können, sondern zugleich durch Schaffung einer zweckmäßigen Darstellungsmethode des reinen Azurs sowohl der rein wissenschaftlichen Forschung auf diesem Gebiet als auch besonders den Tropenärzten für die klinische Diagnostik bei der Malaria ein brauchbares und zuverlässiges Hilfsmittel an die Hand gegeben zu haben.

---

1) Bei längerem Verweilen im Eosinbade wird der basische Farbstoff durch den überschüssigen sauren völlig ausgezogen.

2) Mit Zuhilfenahme des gewöhnlichen Phenols, desgleichen der beiden Trioxyphenole Pyrogallol und Phloroglucin gelang Nocht die Färbung nicht.

3) Michaelis, L., Diese Zeitschr. Abt. I. Bd. XXX. p 626.

4) Vorausgesetzt, daß M. durch Verwendung eines völlig methylenblaufreien Azurs zu seinem Resultat gelangt ist.

5) Freilich erwähnt M. in keiner dieser Arbeiten, daß auch das Protoplasma der Malariaparasiten mit reinem Azur-Eosin sich blau färbt, eine Thatsache, die ja ebenfalls von erheblichem Interesse ist.

Ein Beitrag zur Frage der Anwendung des Formaldehydgases zur Desinfektion[1]).

Von **O. Voges**, Buenos Aires.

Als bald nach meinem Eintreffen in Buenos Aires von mir der Ausbruch der Bubonenpest in Südamerika festgestellt wurde, konnte ich meiner vorgesetzten Behörde den Vorschlag der Anwendung der Formalindesinfektion machen, welche kurz vorher Gegenstand eingehender günstiger Versuche im Institut für Infektionskrankkeiten gewesen war. Es ist daraufhin die Desinfektion mit in Wasser verdünnten Formalindämpfen allgemein eingeführt, und haben wir überall dort, wo hinreichend gut geschlossene Räume zur Desinfektion vorhanden waren, immer mit bestem Erfolg von dieser Methode Gebrauch gemacht. Leider war die Anwendung sehr beschränkt, da die Leute auf dem Lande durchweg in Lehmhütten, Ranchos, leben, in denen die Wände mehr Löcher als festes Material zeigen, so daß von einem Konstanthalten von Gasen nicht mehr die Rede sein konnte.

Als ein wesentlicher Uebelstand bei den sonst sehr schätzbaren Vorzügen der Formalindesinfektion hat sich die lange Dauer der zur Desinfektion notwendigen Zeit erwiesen, und dieser Uebelstand machte sich noch doppelt empfindlich geltend, wenn es galt, das Gepäck der mit den Schiffen ankommenden Reisenden zu desinfizieren. Reisende kann man nicht 12 Stunden aufhalten, und doch giebts kein anderes brauchbares Verfahren für gewisse Dinge, wie Handschuhe, Hüte Muffen, Pelzkragen etc. etc. Unser unablässiges Bestreben war deshalb darauf gerichtet, die Zeitdauer der Formaldehydeinwirkung möglichst abzukürzen. Flügge hat nun zwar gezeigt, daß man durch konzentrierte Formalinwasserdämpfe die Desinfektionszeit auf $3^1/_2$ Stunden abkürzen kann, aber dadurch sind wir gezwungen, relativ große Mengen von Formalin anzuwenden, wodurch einmal die Desinfektion immerhin recht kostspielig wird, dann aber ist mit einer Zeitdauer von 4 Stunden auch noch nicht viel geholfen.

Nun macht sich bei der Formalindampfdesinfektion noch ein zweiter Umstand geltend, der zum Nachteil der Methode wirkt. Der Dampf dringt nicht tief genug in die Objekte ein und die lange Desinfektionsdauer ist im wesentlichen ja durch das langsame Eindringen des Formalins bedingt.

Nach vielen Experimenten und Variationen des Systems sind wir auf den Gedanken gekommen, das Vakuum in Benutzung zu ziehen, und ich bin gern der Aufforderung des Präsidenten des Departamento national de Higiene Dr. Malbran gefolgt, in dieser Richtung die eingehendsten Versuche anzustellen, deren Resultate ich hier im Auszug mitteilen möchte, da sie in der That einen hochbedeutsamen Fortschritt darstellen. Ehe ich indes zur Mitteilung meiner Versuchsergebnisse schreite, muß ich mich entschuldigen. Es wäre immerhin möglich, daß bereits von anderer Seite ähnliche Versuche gemacht wären. Mir steht hier leider nur eine äußerst beschränkte Litteratur zur Verfügung, doch

1) Entnommen aus meinem Bericht an den Präsidenten des Departamento national de Higiene Buenos Aires.

habe ich darin nichts über unseren Gegenstand entdecken können. Sollten meine Versuche schon anderweitig angestellt sein, so mag man sie immerhin als eine Ergänzung hinnehmen.

Bevor ich auf die Versuche selbst eingehe, muß ich zunächst die zu denselben konstruierten Apparate sowie die Anordnung des Experimentes mitteilen.

Als Aufnahmegefäß für die Testobjekte und die Formalindämpfe und gleichzeitig für die Herstellung des Vakuums dient ein nach Art des Erlenmeyer'schen Kolben hergestelltes Glasgefäß von 3 Liter Inhalt, wie es für die Pukallfilter in Anwendung gebracht ist. Die obere große Flaschenöffnung wird mit einem Gummikork, der zweifach durchbohrt ist, fest verschlossen. Die erste Durchbohrung des Gummikorken wird mit der Wasserstrahlluftpumpe in Verbindung gebracht, in die zweite wird ein Thermometer von 100° C eingelassen. Die seitliche Oeffnung der Pukallflasche wird mit einem ca. $^1/_2$ m langen Gummischlauch armiert, dessen anderes Ende mittels Klemme luftdicht geschlossen ist.

In diesen Apparat hinein werden nunmehr die zu desinfizierenden Objekte gelegt. Als Testobjekte wurden an Seidenfäden angetrocknete Milzbrandsporen, ferner frische, höchstens 24 Stunden alte Kulturen von Staphylococcus aureus und Typhus abdominalis verwandt. Die letzteren wurden als Bouillonkulturen oder als in Bouillon aufgeschwemmte Agarkulturen verwandt; mit dieser Bakterienemulsion werden kleine, ca. 3—5 qcm große, grobe, graue Leinwandläppchen getränkt. Diese Objekte werden in trockene Taschentücher eingewickelt derart, daß sie ein ziemlich festes Bündel bilden, das durch einen Bindfaden zusammengehalten wird. So vorbereitet, kommt das Bündelchen in das Glasgefäß. Darauf wird der Apparat durch flüssig gemachtes Paraffin luftdicht geschlossen. Vermittelst der Wasserstrahlvakuumpumpe konnte nun ohne besondere Schwierigkeiten in relativ kurzer Zeit ein Vakuum von 75 ccm erzielt werden. Das Konstantbleiben desselben nach Abstellung der Luftpumpe war der Beweis für die Vollständigkeit der Dichtung des Apparates.

Die Formaldehyddämpfe wurden in einem neben dem Vakuumapparat stehenden Autoclaven entwickelt. Durch Oeffnen des Ventils desselben hatte man es jeden Augenblick in der Gewalt, die Dämpfe in beliebiger Menge ausströmen zu lassen. Durch Verbindung dieses Ventils mit dem Vakuumapparate mittels des abklemmbaren Gummischlauches kann man jedes beliebige abmeßbare Quantum Dampf einlassen. An der Manometernadel kann man bequem ablesen, bis zu welchem Grade das Vakuum ausgeglichen ist.

Die in dieser Weise angestellten Versuche ergaben indes noch keineswegs befriedigende Resultate. Es galt zunächst, noch eine Reihe weiterer Schwierigkeiten aus dem Wege zu räumen.

Zunächst müssen wir uns klar werden, daß der Autoklav mit Luft angefüllt ist. Bei dem Ueberleiten der Formaldehydwasserdämpfe in das Vakuum wird diese Luft des Antoklaven auch mit herübergerissen, wir benutzen somit eine ganz wesentlich luftverdünnte Dampfmischung, deren Effekt dadurch derartig herabgesetzt wurde, daß die Desinfektion häufig gleich Null war. Diese Fehlerquelle läßt sich indes leicht ausschalten, wenn man die ersten sich bildenden Dämpfe ins Freie streichen läßt und den Apparat erst schließt, wenn man annehmen kann, daß alle Luft ausgetrieben ist. Dadurch geht eine gewisse Menge Formalindampf verloren, welche das experimentelle Arbeiten in dem Raume, wo die Apparate aufgestellt waren, ganz ungemein erschwerten.

Als zweites Hindernis, welches sich für die gute Fortentwickelung der Experimente recht störend bemerkbar machte, muß der Umstand erwähnt werden, daß die überhitzten Formalinwasserdämpfe bei ihrem Ueberströmen in den Vakuumapparat diesen letzteren in überaus störender Weise erwärmten, wodurch eine Temperaturerhöhung von 45—70° C hervorgerufen wurde. Das sind Temperaturen, welche aber an sich schon das Bakterienleben schädigen, wenn nicht gar ersticken, wodurch die Deutung der Versuchsergebnisse nicht wesentlich getrübt werden muß. Kontrolliert man indes diese Verhältnisse genauer, so stellt sich glücklicherweise heraus, daß diese Erwärmung des Thermometers immer nur dann statt hat, wenn die Quecksilberröhre gerade der Einströmungsstelle des Dampfes gegenüber steht. An allen übrigen Stellen des Gefäßes wurde der Dampf so rasch abgekühlt, daß es nur zu einer unwesentlichen Temperatursteigerung kommt, ganz besonders aber wurden die am Boden des Gefäßes liegenden Testobjekte so gut wie gar nicht erwärmt. Auch in den oberen Teile des Gefäßes, wo die Erwärmung statthatte, war sie nur so momentan, daß nicht einmal das Paraffin, welches zum Dichten des Korkes gebraucht war, flüssig wurde. Die Berücksichtigung dieser Verhältnisse kann für die Praxis ganz belanglos sein, im Gegenteil, eine geringe Wärmesteigerung von von 45—70° C kann nur dazu beitragen, die Desinfektionswirkung zu verstärken, kommt also in diesem Fall sogar recht erwünscht. Anders liegt die Sache allerdings in unseren Experimenten, wo es lediglich auf Feststellung der reinen Formalinwirkung ankommt.

Dieses konnte nun dadurch erreicht werden, daß einmal das Vakuumgefäß in Eiswasser gestellt wurde, gleichzeitig wurde aber auch in den die Formalindämpfe zuführenden Schlauch ein Stück Glasrohr mit ganz kleinem Oeffnungsquerschnitt eingeschaltet, so daß das Formalin nur ganz langsam einströmen konnte. Dadurch wurde erreicht, daß die Temperatur des Vakuumapparates sich nie über 38° C erhob und in der Regel nur 20—25° C hatte, je nach dem Stande der Außentemperatur.

Unter Beobachtung aller dieser kleinen Kautelen kann man in der That die Versuche einwandsfrei gestalten. Nach Beendigung des Versuches konnte das Formaldehydgas durch die Vakuumpumpe auf äußerst bequeme Weise wieder entfernt werden. Nach der Herausnahme haftet den Testobjekten nur noch ein sehr mäßiger Formalingeruch an, der an der Luft sich in kurzer Zeit verflüchtigt. Durch diese Methode kann man die Gegenstände in denkbar einfachster Weise wieder gebrauchsfähig machen, jedenfalls in einfacherer Weise als durch die umständliche Ammoniakräucherung, die noch dazu wieder recht zeitraubend ist. Bei uns wenigstens vermochte sich diese Methode nie recht einzubürgern.

Um sich aber zu vergewissern, ob wirklich durch die Desinfektion nach der Herausnahme der Objekte eine absolute Desinfektion erzielt worden ist, oder ob es sich nur um eine Entwickelungshemmung der Testbakterien in den Aussaaten handelt, die immer noch hervorgerufen sein kann durch Spuren von Formalin, muß man daran denken, diese eventuellen Reste noch zu beseitigen. In der mir zur Verfügung stehenden Litteratur habe ich nichts darüber gefunden, wie man diese Spuren des Desinfektionsmittels entfernen könnte; ich habe es dadurch versucht, daß ich die Testleinwandstückchen in größere Mengen von Bouillon verimpfe, z. B. $^1/_2$—1 Liter pro Läppchen. Schüttelt man die Läppchen in dieser großen Flüssigkeitsmenge tüchtig herum, so werden etwaige anhaftende Formalinspuren derartig verdünnt, daß eine Entwickelung der

Bakterien nicht mehr behindert wird. In die steril gebliebenen Versuchskolben wurden später die Testbakterien verimpft und sie entwickelten sich in jedem Falle ungestört, als Beweis, daß eine Formaldehydwirkung ausgeschlossen werden mußte. Auf der anderen Seite war diese Maßnahme indess durchaus notwendig, impfte man nämlich mit demselben Testobjekt ein Reagenzröhrchen mit Bouillon und einen Bouillonkolben, so trat öfters in letzterem noch ein Wachstum auf, während das Röhrchen steril blieb, ein Beweis, daß mit den Leinwandläppchen Formalinspuren übergeimpft wurden, die unter gewissen Bedingungen entwickelungshemmend wirken können.

Die Versuche selbst zur Desinfektion unserer Testleinwandobjekte sind zunächst mit reinem Formalin, von der chemischen Fabrik von E. Merck, Darmstadt bezogen, ausgeführt. Das Resultat war ein vollständig negatives, eine gelungene Desinfektion trat nicht ein. Es war das auch nicht anders zu erwarten, da bekanntlich bei der trockenen Destillation des Formaldehyds dieses in die Paraformverbindung übergeht, die sich als unwirksam in Bezug auf die Desinfektionskraft erwiesen hat.

Es wurde nun zwischen Gasentwickelungsapparat und der Vakuumflasche eine zur Hälfte mit Wasser angefüllte Wulff'sche Flasche eingeschaltet, um ein Sättigung des Formalindampfes mit Wasser zu erzielen. Es wurden aber bei dieser Versuchsanordnung derartige Mengen von Formaldehydgas vom Wasser absorbiert, daß nach halbstündigem Arbeiten des Apparates das Vakuum noch nicht ausgeglichen war. Da es für die Formalinverdampfung darauf ankommt, dieselbe auf eine möglichst kurze Zeit zu beschränken, so verbietet sich schon von selbst die Anwendung dieser Methode in der Praxis, abgesehen davon, daß die Desinfektionswirkung auch viel zu wünschen übrig ließ.

Ich habe nunmehr auf das Formaldehyd-Wassergemisch zurückgegriffen, welches seither die besten Resultate in der Praxis gezeitigt hat. Es wurden 600 Formaldehyd mit 2400 Wasser gemischt. Die Dämpfe dieses Gemisches bieten uns die beste Garantie, daß wir wirklich Formaldehyddämpfe und nicht Paraformdämpfe entwickeln. Wir wissen, daß man auf diese Weise eine genügend kräftige Flächendesinfektion erzielen kann und daß diese Menge ausreicht, um 100 cbm Rauminhalt zu desinfizieren.

In unseren Versuchen kam es nun darauf an, nachzuweisen, ob die Menge Formaldehydwasserdampf, welche erforderlich ist, um das Vakuum von 75 cm auszugleichen, hinreicht, um eine sichere Desinfektion vornehmlich auch in der Tiefe durchzuführen.

Ich teile nunmehr die Versuche selbst mit:

I. Versuch.

Einführung des Formaldehydwasserdampfes bis zur Ausgleichung des Vakuums. Verschluß des Apparates. Einwirkungsdauer des Desinfektionsmittels 7 Stunden.

Resultat: Typhusbacillus abgetötet.
Staphylococcus aureus abgetötet.
Milzbrandbacillus abgetötet.

Nachdem der wiederholt angestellte Versuch die gelungene Desinfektion sicher erwiesen hatte, konnte die Zeitdauer abgekürzt werden.

II. Versuch.

Anordnung des Experimentes wie in Versuch I. Einwirkungsdauer des Desinfektionsmittels 5 Stunden.

Resultat: Typhusbacillus abgetötet.

Staphylococcus aureus abgetötet.
Milzbrandbacillus abgetötet.

Auf Grund des wiederholten günstigen Ausfalles dieses Versuches wurde die Zeitdauer nochmals abgekürzt

III. Versuch.

Anordnung des Experimentes wie in Versuch I. Einwirkungsdauer des Desinfektionsmittels 3 Stunden.

Resultat: Typhusbacillus abgetötet.
Staphylococcus aureus abgetötet.
Milzbrandbacillus abgetötet.

Das gute Resultat wurde wiederholt bestätigt; daher wurde die Zeitdauer nochmals abgekürzt.

IV. Versuch.

Anordnung des Experimentes wie in Versuch I. Einwirkungsdauer des Desinfektionsmittels 2 Stunden.

Resultat: Typhusbacillus abgetötet.
Staphylococcus aureus abgetötet.
Milzbrandbacillus abgetötet.

Infolge des wiederholt günstigen Ergebnisses konnte die Zeitdauer noch mehr abgekürzt werden.

V. Versuch.

Anordnung des Experimentes wie in Versuch I. Einwirkung des Desinfektionsmittels 1 Stunde.

Resultat: Typhusbacillus abgetötet.
Staphylococcus aureus abgetötet.
Milbrandbacillus abgetötet.

Da auch dieser Versuch wiederholt günstig ausfiel, wurde die Zeitdauer nochmals abgekürzt.

VI. Versuch.

Anordnung des Experimentes wie in Versuch I. Einwirkung des Desinfektionsmittels 1/2 Stunde.

Resultat: Typhusbacillus abgetötet.
Staphylococcus aureus abgetötet.
Milzbrandbacillus abgetötet.

Das wiederholt günstige Ergebnis veranlaßte eine noch weitere Herabsetzung der Einwirkungszeit.

VII. Versuch.

Anordnung des Experimentes wie in Versuch I. Einwirkung des Desinfektionsmittels 20 Minuten.

Resultat: Typhusbacillus abgetötet.
Staphylococcus aureus abgetötet.
Milzbrandbacillus zweifelhaft.

Die Milzbrandkulturen waren manchmal steril, in anderen Fällen jedoch waren sie gewachsen. Eine sichere Desinfektion kann daher nicht mehr erzielt werden.

VIII. Versuch.

Anordnung des Experimentes wie in Versuch I. Einwirkung des Desinfektionsmittels 10 Minuten.

Resultat: Typhusbacillus abgetötet.
Staphylococcus aureus wächst in den Kulturen, aber sehr langsam, erst nach 2 Tagen.

Milzbrandbacillus wächst in den Kulturen, aber sehr langsam, erst in 2 Tagen.

IX. Versuch.

Anordnung des Experimentes wie in Versuch I. Einwirkung des Desinfektionsmittels 5 Minuten.

Resultat: Typhusbacillus nicht abgetötet.
Staphylococcus aureus nicht abgetötet.
Milzbrandbacillus nicht abgetötet.

Aus der Summe der mitgeteilten Versuche geht hervor, daß es mit Sicherheit gelingt, die Formaldehyddesinfektion so wirksam zu gestalten, daß die Desinfektionsobjekte in kürzester Zeit desinfiziert sind. Es interessierte uns nun noch die Frage, ob die Desinfektion auch noch erreicht werden könnte, wenn das Vakuum weniger hoch war. Es ist aus diesem Grunde eine Reihe weiterer Versuche in der nämlichen Weise ausgeführt, wie die bereits mitgeteilten, nur mit dem einzigen Unterschiede, daß die Luftverdünnung nur bis zu 20—30 cm getrieben wurde. Der Erfolg war im Vergleich zu unseren obigen ausgezeichneten Resultaten ein gänzlich negativer, insofern eine 5-stündige Einwirkung des Formaldehydwasserdampfes noch keine Desinfektion zustande brachte.

Wir werden also in der Praxis immer mit einem höheren Vakuum rechnen müssen.

Wenn wir uns das Zustandekommen der Desinfektion vergegenwärtigen wollen, so ergiebt sich auch der praktische Erfolg ganz von selbst aus der theoretischen Ueberlegung. Das Formalin kann nur wirken durch länger andauernden innigsten Kontakt mit den Bakterien. Bringt man Formalindämpfe in einen Luftraum, so ist es klar, daß nur so lange der Kontakt mit den Bakterien hergestellt bleibt, als keine Verdunstung eintritt, wobei wir immer eines hohen Feuchtigkeitsgrades benötigen. Besser und nachhaltiger wird dieser Effekt gewiß erzielt durch Ersetzung des Wassers durch Glycerin, da dieses weniger schnell verdunstet. Aber dieses Mittel dringt einmal weniger leicht in die Tiefe und dann läßt es überall einen klebrigen Belag zurück, der so gut wie gar nicht entfernt werden kann. Wie anders liegen die Verhältnisse im luftverdünnten Raum. Die Dämpfe stürzen mit ungeheurer Gewalt in die Luftleere und die luftleeren Räume reißen begierig jede Dampfmenge an sich. So erzielen wir ein ausgezeichnetes Eindringen des Dampfes in die Tiefe und eine äußerst innige Verbindung der Bakterienleiber mit dem Formaldehyddampf, wie wir sie durch nichts anderes herstellen können. Es ist evident, daß der Desinfektionswert dadurch ein ganz bedeutender sein muß, und vor allen Dingen erzielen wir das Eine, eine ausgezeichnete Tiefenwirkung, wie wir sie sonst nie erreichen können.

Ich glaube also, daß diese Ergebnisse ganz hervorragende Wirkung haben müssen in Bezug auf die Ausgestaltung unserer Desinfektionspraxis.

Ueberall dort, wo bisher der strömende Dampf sein Arbeitsfeld fand, wird man nunmehr mit Formalindampf im luftverdünnten Raum arbeiten können.

Es erschien mir nur wichtig, die Frage zu erörtern, ob die Technik imstande ist, in größeren Räumen ein derartig hohes Vakuum in kurzer Zeit herzustellen. Ich habe mich in dieser Frage um Auskunft gewand an den der hiesigen deutschen Gesandtschaft als Sachverständiger beigegebenen Herrn Regierungsbauinspektor Offermann, und versicherte

mir derselbe, daß es keine Schwierigkeiten macht, derartig leistungsfähige Luftpumpen herzustellen.

Die Desinfektion wird sich also in Zukunft so gestalten lassen, daß man größere Räume mit Formaldehydwasserdampf nach Flügge desinfiziert.

Gegenstände kleinerer Art, wie Kleider, Wäsche, Betten, Pelzwaren, Hüte, Schuhe, Bilder, Möbelpolster, Koffer etc. wird man aber im luftverdünnten Raume der Formalineinwirkung aussetzen können. Unter Zugrundelegung von selbst einstündiger Einwirkungsdauer kann die ganze Desinfektion in kürzester Zeit bewältigt werden. Man wird vielfach die gebräuchlichen Dampfdesinfektionsöfen als Vakuumapparat gebrauchen können; diese Apparate können ebensooft beschickt werden, wie es bei der früheren Dampfdesinfektion der Fall war, und man wird selbst die empfindlichsten Gegenstände in kürzester Frist absolut wohlerhalten und unverdorben zurückerhalten können.

Ich glaube, dann werden auch die Klagen des Publikums von selbst verstummen und anstatt, daß die Desinfektion heute immer zum mindesten einen gelinden Schrecken hervorrufen wird, dürfen wir noch erleben, daß man sich freiwillig und gern zu den Desinfektionsapparaten hindrängen wird.

Es war mir leider nicht möglich, selbst Versuche mit größeren Apparaten vorzunehmen, da mir eine genügend große Luftpumpe fehlte. Indes, warum sollten die Verhältnisse dadurch anders werden? Im Gegenteil, in der Praxis stelle ich weit weniger hohe Anforderungen, weil man einmal die Gegenstände immer möglichst locker ausbreiten und aufhängen wird, um die Desinfektionszeit abzukürzen, sodann aber will man ja auch nicht immer Milzbrandsporen abtöten. Die gewöhnlichen Desinfektionsobjekte, wie Typhusbacillen, Cholerabacillen, Pestbacillen und viele andere mehr sind ungleich leichter zu vernichten und wird ihre vollständige Beseitigung spielend leicht möglich sein.

Eine Anlage in größerem Maßstabe ist jetzt in Buenos Aires geplant bei der Einrichtung eines neuen Sanitätsschiffes, hier, wo es sich um Desinfizierung des Reisegepäcks der Seereisenden handelt, wird die neue Einrichtung unzweifelhaft ganz bedeutende Vorteile gewähren.

Inhalt.

Originalmitteilungen.

Frommannsche Buchdruckerei (Hermann Pohle) in Jena.

CENTRALBLATT

für

Bakteriologie, Parasitenkunde und Infektionskrankheiten

Erste Abteilung:

Mediz.-hygien. Bakteriologie u. tier. Parasitenkunde

Originale

In Verbindung mit

Geh. Med.-Rat Prof. Dr. Loeffler, Prof. Dr. R. Pfeiffer, Prof. Dr. M. Braun
Greifswald Königsberg i. Pr.

herausgegeben von

Dr. O. Uhlworm in Berlin W., Schaperstr. 2/3 I

Verlag von Gustav Fischer in Jena

XXXII. Band. — Jena, den 5. September 1902. — **No. 5.**

Preis für den Band (50 Bogen) 15 Mark. Schwierige Tafeln werden einem Bogen gleich gerechnet. — Die Nummern erscheinen zwanglos je nach dem vorliegenden Stoffe. Bei Einzelverkauf Preis für einen einfachen Druckbogen 40 Pfg., für eine Tafel 60 Pfg.

Hierzu als regelmäßige Beilage die Inhaltsübersichten der II. Abteilung des Centralblattes.

Die Redaktion des „Centralblatts für Bakteriologie und Parasitenkunde“ richtet an die Herren Mitarbeiter die ergebene Bitte, etwaige Wünsche um Lieferung von besonderen Abdrücken ihrer Aufsätze entweder bei der Einsendung der Abhandlungen an die Redaktion auf das Manuskript schreiben zu wollen oder spätestens nach Empfang der ersten Korrekturabzüge direkt an den Verleger, Herrn Gustav Fischer in Jena, gelangen zu lassen.

Original-Mitteilungen.

Die wichtigsten Methoden der Bakterienfärbung in ihrer Wirkung auf die Membran, den Protoplasten und die Einschlüsse der Bakterienzelle.

[Arbeit aus dem Botanischen Institute der Universität Marburg.]

Von **Arnold Grimme,**
Kreistierarzt in Melsungen (Hessen-Nassau).

Mit 2 Tafeln.

(Schluß.)

5. Membran. Die Membran färbte sich bei B. tumescens, B. cohaerens mit Jodjodkalium gelb, mit Formolfuchsin meist deutlich rot, mit verdünntem Methylenblau meist sehr schwach blau.

In den Trockenpräparaten wurde sie ebenfalls bei Färbung mit

kalter Methylenblaulösung 1 + 10 nur schwach gefärbt, die jungen Septen blieben ungefärbt. In den erhitzten Farblösungen färbte sie sich um so stärker, je länger jene einwirkten. Von Fuchsin und besonders von Karbolfuchsin wurde sie schon bei Zimmertemperatur kräftig gefärbt. Am besten erkannte man die Membranfärbung an plasmolysierten Stellen. Die an den degenerierten Zellen von B. cohaerens nachweisbaren Polfelder (siehe p. 12 und Fig. IX *e*) erwiesen sich als der Membran zugehörig. Ich halte diese ovalen Polsegmente für Bilder der umgeschlagenen Quermembran, welche erst bei den zusammengefallenen, plasmaarmen oder -leeren Stäbchen besonders sichtbar wird. Auch an plasmareichen Zellen konnte ich dieselben durch Plasmolysierung mit stärkerer Jodjodkaliumlösung freilegen und nach Ausspülen mit Wasser in Fuchsin färben. Hierdurch habe ich den Beweis geliefert, daß diese Gebilde nicht Protoplasmareste sind.

Durch die Aufnahme der Fuchsinfarbe durch die Membran war es mir sogar gelungen, bei degenerierten Stäbchen von B. cohaerens eine Kontrastfärbung der Gram'schen Färbung gegenüber an derselben Zelle hervorzurufen (Membran rot, Plasmareste blauschwarz) (siehe p. 15 und Fig. IX *i*).

Die stellenweise bei der Untersuchung in Wasser beobachteten Umrandungen der Zellmembran (siehe Fig. II *b* und Fig. III *c*) waren nicht in Kanadabalsam zu sehen. Hiermit hängt auch eine Erscheinung zusammen, die regelmäßig einen auffallenden Unterschied zwischen in Wasser und in Kanadabalsam liegenden Präparaten bildet, nämlich die Erscheinung, daß an den in Wasser liegenden Präparaten stets ein fast überall gleichmäßig breiter, ungefärbter Zwischenraum zwischen den nebeneinander liegenden Stäbchen sich bemerkbar macht, welcher bei B. tumescens ungefähr halb so breit ist als die gefärbte Zelle. Bei den in Kanadabalsam liegenden Stäbchen desselben Präparates fehlt dieser Zwischenraum, es liegen die Zellen unmittelbar aneinander, Membran an Membran. Um die Ursache dieser Erscheinung zu erfahren. stellte ich folgenden Versuch an. Einen aus etwa 30 nebeneinander liegenden Zellen bestehenden Bakterienhaufen eines in Wasser liegenden Trockenpräparates stellte ich ein und zeichnete mit Hilfe des Zeichenapparates seinen Umriß. Nach etwa 2 Stunden zeichnete ich den Umriß desselben jetzt ausgetrockneten Haufens, dessen Zellen nunmehr Wand an Wand lagen und keine ungefärbten Zwischenräume zeigten. Der von der eingetrockneten Bakteriengruppe jetzt eingenommene Raum war etwa um ein Drittel kleiner als der im feuchten Zustande bedeckte. Es ist hiernach mit Sicherheit anzunehmen, daß jede Zelle von B. tumescens und B. cohaerens, welche Species ich näher prüfte, von einer Schleimschicht umgeben ist, die beim Eintrocknen bis auf ein Minimum schwindet. Vermittelst dieser Schleimschicht der Membran hängen die Bakterien verhältnismäßig fest aneinander; eine Bakteriengruppe bildet ein zusammenhängendes Ganze und zieht sich beim Eintrocknen der Schleimhüllen deshalb auch in toto zusammen, so daß die an der Peripherie gelegenen Zellen ihren Platz verlassen und sich der Mitte nähern müssen. Beim Wiederanfeuchten vollzieht sich der Vorgang in umgekehrter Reihenfolge. Die durch einen feinen, bald mehr bald weniger deutlich gefärbten Rand begrenzte, ungefärbte Zone, welche in vielen Präparaten besonders einzeln liegende Zellen umgab, bezeichnete die der Membran anhaftende Schleimschicht. Die undeutliche, schwache Färbung kam vermutlich dadurch zustande, daß feine Farbstoffpartikelchen auf dem Schleime nieder-

geschlagen wurden. Bei den Thimotheebacillen konnte ich eine Schleimhülle der Membran nicht mit Sicherheit konstatieren, obwohl auch diese oft bestimmte Zwischenräume zwischen den einzelnen Zellen zeigen. Es bleiben solche ungefärbten Zwischenräume jedoch bei nach der Ziehlschen Färbung behandelten Präparaten auch nach der Einbettung in Kanadabalsam bestehen (Fig. X f^4). Ich schließe auf das Vorhandensein einer Schleimhülle aber daraus, daß die ungefärbten Zwischenräume in Kanadabalsam schmäler sind. Die Membran selbst des Thimotheebacillus färbt sich ebenfalls mit Fuchsin besser als mit Methylenblau. Nach der Behandlung mit Säure und Alkohol ist jedoch auch die Fuchsinfärbung der Membran nur noch schwach. Ob die ungefärbten oder schwach gefärbten Zwischenräume zwischen den Stäben, die selbst nach der völligen Eintrocknung noch erhalten sind, einer ziemlich dicken Membran zukommen oder einer sich nur schwach zusammenziehenden Schleimschicht, konnte ich nicht feststellen. Schon Koch (1884) hat an Tuberkelbacillen eine stärker membranfärbende Wirkung des Fuchsins beobachtet. Er konstatierte, daß die Bacillen nach Methylenblaufärbung stets schmäler und beim Aneinanderliegen durch ungefärbte Zwischenräume getrennt waren, nach Fuchsinfärbung jedoch breiter waren und sich unmittelbar berührten.

B. Sporen.

Die völlig ruhenden, reifen, freien Sporen färben sich in kalter Farblösung nicht und schwach in den erhitzten Lösungen. Die kurz vor der Keimung stehenden, angeschwollenen Sporen färben sich gut, sowohl in kalter wie in heißer Farblösung.

1. Ruhende Sporen.

Membran. Diese färbt sich erst in stärker erhitzter Farblösung kräftig, und zwar nur ihre Exine, nicht die Intine.

Protoplast. Derselbe bleibt ungefärbt.

2. Angeschwollene Sporen.

Membran. Die Exine färbt sich leicht. Die sehr dick gewordene Intine bleibt in der Regel ungefärbt. Nur in stärker erhitzten Farblösungen nahm sie bei B. tumescens Färbung an, bei B. cohaerens nicht.

Protoplast. Derselbe färbt sich nach allen Färbemethoden kräftig.

3. Sporenanlagen.

Dieselben zeigen sich als scharf begrenzte, in den ersten Anfängen der Membran des Zellpoles unmittelbar anliegende und mit der betreffenden Farbe sich sehr kräftig färbende Segmente oder halbkugelige, seltener länglich runde Gebilde, die sich mehr und mehr abrunden und nach der Mitte der Zelle hinrücken, wo sie erst die endgiltige ovale Gestalt annehmen. In heißer Farblösung behandelt, treten sie nicht mehr so scharf gegen das ebenfalls stark gefärbte Cytoplasma hervor. Wenn die Septe zwischen zwei Zellen noch nicht deutlich ausgeprägt war, konnten durch die Färbung der polaren Sporenanlagen sogar „bipolare Färbungen“ hervorgerufen werden (Fig. IV d'''). Die Sporenanlagen bleiben besonders kräftig und lange gefärbt nach Anwendung der Gram'schen Methode und folgender allmählicher Entfärbung in Alkohol. Auch nach der Ziehl'schen Tuberkelbacillenfärbung entfärben sie sich nicht, sondern

behalten eine kräftig rote Farbe, während alle übrigen Zellbestandteile die Farbe völlig verlieren. Die Sporenanlagen von B. cohaerens, welche sich zwar auch kräftig färben, geben jedoch die Farbe nach Einwirkung von Säuren oder längerem Aufenthalt in Alkohol bedeutend schneller ab.

Litteraturverzeichnis.

Albert, R. und W., Chemische Vorgänge in der abgetöteten Hefezelle. (Centralbl. f. Bakt. II. Abt. Bd. VII. 1901.)

Aronson, Zur Biologie der Tuberkelbacillen. (Berl. klin. Wochenschr. 1898.)

Babes, Ueber isoliert färbbare Anteile der Bakterien. (Zeitschr. f. Hyg. Bd. V. 1889.)

— —, Beobachtungen über die metachromatischen Körperchen, Sporenbildung, Verzweigung, Kolben- und Kapselbildung pathogener Bakterien. (Zeitschr. f. Hyg. Bd. XX. 1895.)

Bienstock, Zur Frage der sog. Syphilisbacillen und der Tuberkelbacillenfärbung. (Fortschr. d. Med. 1886.)

Bitter, Ueber Syphilis- und Smegmabacillen nebst Bemerkungen über die färberischen Eigentümlichkeiten der Smegma- und Tuberkelbacillen. (Arch. f. path. Anat. u. Physiol. u. f. klin. Med. Bd. CVI. 1886.)

Braem, Untersuchungen über die Degenerationserscheinungen pathogener Bakterien in destilliertem Wasser. (Beitr. z. path. Anat. u. zur allgem. Path. Bd. VII. 1890.)

Bunge, Ueber Sporenbildung bei Bakterien. (Fortschr. d. Med. Bd. XIII. 1895.)

Cahn, Ueber die nach Gram färbbaren Bacillen des Säuglingsstuhles. (Centralbl. f. Bakt. I. Abt. Bd. XXX. 1901.)

Coppen-Jones, Ueber Morphologie und systematische Stellung des Tuberkelbacillus. (Centralbl. f. Bakt. Bd. XVII. 1895.)

Czaplewski, Bemerkungen zur Gram'schen Methode der Bakterienfärbung. Eine zweckmäßige Nachfärbung zur Gram'schen Methode. (Hyg. Rundschau. 1896.)

Dorset, A new stain for B. tuberculosis. (Reports and papers of the Americain Public Health Assoc. Vol. XXIV. 1898. Referat im Centralbl. f. Bakt. Bd. XXVI. 1899.)

Ehrlich, Färbung der Tuberkelbacillen. (D. med. Wochenschr. 1882.)

Ernst, P., Ueber den Bacillus der Xerose und seine Sporenbildung. (Zeitschr. f. Hyg. Bd. IV. 1888.)

— —, Ueber Kern- und Sporenbildung bei Bakterien. (Zeitschr. f. Hyg. Bd. V. 1889.)

— —, Ueber den Bau der Bakterien. (Centralbl. f. Bakt. II. Abt. Bd. VIII. No. 1. 1902.)

Feinberg, Ueber den Bau der Bakterien. (Centralbl. f. Bakt. I. Abt. Bd. XXVII. 1900.)

Fischel, Untersuchungen über die Morphologie und Biologie des Tuberkuloseerregers. (Fortschr. d. Med. Bd. X. 1892.)

Fischer, Alfred, Untersuchungen über den Bau der Cyanophyceen und Bakterien. Jena 1897.

— —, Färbung, Fixierung und Bau des Protoplasmas. Jena 1899.

Flügge, C., Die Mikroorganismen. Leipzig 1896.

Gottheil, Botanische Beschreibung einiger Bodenbakterien. Beiträge zur Methode der Speciesbestimmung und Vorarbeit für die Entscheidung der Frage nach der Bedeutung der Bodenbakterien für die Landwirtschaft. (Centralbl. f. Bakt. II. Abt. Bd. VII. 1901.)

Gottstein, Ueber Entfärbung gefärbter Zellkerne und Mikroorganismen durch Salzlösungen. (Fortschr. d. Med. 1885.)

— —, Die Beeinflussung des Färbeverhaltens von Mikroorganismen durch Fette. (Fortschr. d. Med. 1886.)

Gram, Ueber die isolierte Färbung der Schizomyceten. (Fortschr. d. Med. 1884.)

Grigorjew, Zur Frage über die Färbbarkeit der Mikroorganismen nach der Ziehl-schen Methode. (Russkaja Medicina. 1886. Referat von Heydenreich in der Zeitschrift für wissenschaftliche Mikroskopie und mikroskopische Technik. Bd. IV. 1887.)

Günther, Einführung in das Studium der Bakteriologie. Leipzig 1898.

Hammerschlag, Bakteriologisch-chemische Untersuchungen über Tuberkelbacillen. (Centralbl. f. klin. Med. 1891.)

Helbing, Erklärungsversuch für die spezifische Färbbarkeit der Tuberkelbacillen. (D. med. Wochenschr. Jahrg. XXVI. 1900 (Vereinsbeilage).

Hijmanns van den Berg, Ueber das Verhalten des Gonococcus zur Gram'schen Färbemethode. (Centralbl. f. Bakt. Bd. XX. 1896.)

Joest, Grundzüge der bakteriologischen Diagnostik der tierischen Infektionskrankheiten. Berlin 1901.

Kisskalt, Eine Modifikation der Gram'schen Färbung. (Centralbl. f. Bakt. Bd. XXX. 1901.)

Klebs, E., Ueber heilende und immunisierende Substanzen aus Tuberkelbacillenkulturen. (Centralbl. f. Bakt. Bd. XX. 1896.)

Klein, E., Zur Kenntnis der Verbreitung des Bacillus tuberculosis und pseudotuberculosis in der Milch, sowie der Biologie des Bacillus tuberculosis. (Centralbl. f. Bakt. I. Abt. Bd. XXVIII. 1900.)
Koch, R., Zur Untersuchung von pathogenen Organismen. (Mitteil. a. d. Kaiserl. Gesundheitsamt. Bd. I. 1881.)
— —, Ueber neue Tuberculinpräparate. (D. med. Wochenschr. 1897.)
Koch, R., Die Aetiologie der Tuberkulose. (Mitteil. a. d. Kaiserl. Gesundheitsamt. Bd. II. 1884.)
Krompecher, Untersuchungen über das Vorkommen metachromatischer Körnchen bei sporentragenden Bakterien und Beiträge zur Kenntnis der Babes-Ernst'schen Körperchen. (Centralbl. f. Bakt. Bd. XXX. 1901.)
Kutscher, Ein Beitrag zur Kenntnis der bacillären Pseudotuberkulose der Nagetiere. (Zeitschr. f. Hyg. Bd. XVIII. 1894.)
Le Doux, Bemerkungen zu dem Artikel des Herrn M. Dorset: „A new stain for B. tuberculosis.“ (Centralbl. f. Bakt. Bd. XXVII. 1900.)
Löffler, Untersuchungen über die Bedeutung der Mikroorganismen für die Entstehung der Diphtherie. (Mitteil. a. d. Kaiserl. Gesundheitsamt. Bd. II. 1884.)
Lutz, Zur Morphologie des Mikroorganismus der Lepra. (Dermat. Studien, herausgegeben von Unna, 1886.)
Mandel, John A., Handbuch für das physiologisch-chemische Laboratorium, enthaltend die Reagentien und Darstellungsmethoden. Berlin 1897.
Marmorek, Beitrag zur Kenntnis der Kultur und Färbung des Tuberkelbacillus. (Zeitschr. f. Tuberkulose und Heilstättenwesen. Bd. I. 1901.)
Marx und Woithe, Morphologische Untersuchungen zur Biologie der Bakterien. (Centralbl. f. Bakt. Bd. XXVIII. 1900.)
Meyer, Arthur, Die Plasmaverbindungen und die Membranen von Volvox. (Botan. Zeitung. 1896. p. 212.)
— —, Erstes mikroskopisches Praktikum. Jena 1898.
— —, Studien über die Morphologie und Entwickelungsgeschichte der Bakterien, ausgeführt an Astasia asterospora A. M. und Bacillus tumescens Zopf. (Flora. 1897. Ergänzungsband.)
— —, Ueber Geißeln, Reservestoffe, Kerne und Sporenbildung bei den Bakterien. (Flora. Bd. LXXXVI. 1899.)
— —, Die Grundlagen und die Methoden für die mikroskopische Untersuchung von Pflanzenpulvern. Jena 1901.
— —, Ueber Verzweigung der Bakterien. (Centralbl. f. Bakt. I. Abt. Bd. XXX. 1901.)
Michaelis, Das Methylenblau und seine Zersetzungsprodukte. (Centralbl. f. Bakt. I. Abt. Bd. XXIX. 1901.)
Mills, Meningite à pneumocoques. (Referat in Baumgarten's Jahresberichten. 1892.)
Moeller, A., Ein Mikroorganismus, welcher sich morphologisch und tinktoriell wie der Tuberkelbacillus verhält. (Berl. Tierärztl. Wochenschr. 1898.)
— —, Ein neuer säure- und alkoholfester Bacillus aus der Tuberkelbacillengruppe, welcher echte Verzweigungsformen bildet. (Centralbl. f. Bakt. Bd. XXV. 1899.)
— —, Die Beziehungen des Tuberkelbacillus zu den anderen säurefesten Bakterien und zu den Strahlenpilzen. (Centralbl. f. Bakt. Bd. XXX. 1901.)
Moeller, H., Ueber eine neue Methode der Sporenfärbung. (Centralbl. f. Bakt. Bd. X. 1891.)
Mühlschlegel, Ein Beitrag zur Morphologie und Entwickelungsgeschichte der Bakterien nach Studien an drei Körnerbacillen. (Arb. a. d. Kaiserl. Gesundheitsamte. Bd. XV. 1899.)
Nakanishi, Ueber den Bau der Bakterien. (Centralbl. f. Bakt. Bd. XXX. 1901.)
Neisser, Versuche über die Sporenbildung bei Xerosebacillen, Streptokokken und Choleraspirillen. (Zeitschr. f. Hyg. Bd. IV. 1888.)
Paltauf, Zur Aetiologie des Skleroms des Rachens, des Kehlkopfes, der Luftröhre und der Nase (Rhinosklerom). (Wien. klin. Wochenschr. 1891 und 1892.)
Pappenheim, Grundriß der Farbchemie. Berlin 1901.
Petterson, Untersuchungen über säurefeste Bakterien. (Berl. klin. Wochenschr. 1899. No. 26.)
Ramond et Ravaut, Les bacilles pseudotuberculeux. (Le Progrès Médical. Année XXIX. 1900.)
Ruppel, Die Proteïne. Marburg 1900.
Sata, Ueber die Fettbildung durch verschiedene Bakterien, nebst einer neuen Färbung des Actinomyces im Schnitte. (Centralbl. f. allg. Path. u. path. Anat. Bd. IX. 1900.)
Schmidt, Zur Kenntnis der Bakterien der Säuglingsfaeces. (Wien. klin. Wochenschr. 1892.)
Schütz, E., Untersuchung der säurefesten Pilze zur Förderung der Molkereiwirtschaft. Inaug.-Diss. Heidelberg, 1900.

Spina, Untersuchungen über die Entfärbbarkeit der mit Anilinfarben tingierten Bakterien. (Allgen. Wien. med. Zeitung. 1887.)
Steinhaus, Beitrag zur Lehre von den sog. sporogenen Körnern. (Referat im biolog. Centralbl. Bd. IX. 1889.)
Trommsdorf, Ueber die Beziehungen der Gram'schen Färbung zu chemischen Vorgängen in der abgetöteten Hefezelle. (Centralbl. f. Bakt. II. Abt. Bd. VIII. 1902.)
Unna, Die Rosaniline und Pararosaniline. Eine bakteriologische Farbenstudie. (Monatsh. f. prakt. Dermat. 1887. Ergänzungsheft 1.)
— —, Die Entwickelung der Bakterienfärbung. Jena 1888.
Vejdovsky, F., Bemerkungen über den Bau und die Entwickelung der Bakterien. (Centralbl. f. Bakt. II. Abt. Bd. VI. 1900.)
Wilde, Ueber den Bacillus pneumoniae Friedländer's und verwandte Bakterien. Inaug.-Diss. Bonn, 1896.
Zettnow, Romanowsky's Färbung bei Bakterien. (Zeitschr. f. Hyg. Bd. XXX. 1899.)
Ziehl, Zur Färbung des Tuberkelbacillus. (D. med. Wochenschr. 1882.)
Zimmermann, Die Bakterien unserer Trink- und Nutzwässer. I. Reihe. Chemnitz 1890.

Tafelerklärung.

Vergrößerung 2350.

Tafel I.

1) Bacillus tumescens.

Fig. I. Sporen. *a* frisch und ungefärbt, *b—d* in verschiedenen Graden der einfachen Fuchsinfärbung, *e* und *f* nicht angeschwollen und angeschwollen (vor der Keimung) nach Ziehl gefärbt, *g* nach Gram.

Fig. II. Keimstäbe (6 Stunden). *a* lebend; *b—d* einfache Fuchsinfärbung, *e* und *f* Färbung nach Ziehl (säurefest) mit Vakuolen bei tiefer Einstellung, bei e^1 eine solche bei hoher Einstellung, *g* und *h* nach Gram.

Fig. III. Ruhestäbe (20—25 Stunden). *a* lebend, Fett mit Sudan gefärbt; *b—d* fixiert und gefärbt mit Fuchsin, *e* mit Methylenblau; *f* nach Gram; *g* und *h* nach dem Bunge'schen Verfahren; *i*, *k* und *l* in Kanadabalsam.

Fig. IV. Sporangien (25—30 Stunden). *a* lebend, mit Fett und Sporenanlage; *b* lebend, gefärbt mit Formolfuchsin (Kerne); *c* lebende Sporangien mit Methylenblau-Sudan gefärbt; die übrigen fixiert: *d—g* einfache Färbungen; *h* nach Ziehl, *i—l* nach Gram gefärbt; *m* Methylenblaupräparat in Kanadabalsam.

2) Bacillus cohaerens.

Fig. V. Sporen. *a* und *b* lebend; *c* und *d* in Methylenblau gefärbt, *e* und *f* nach Ziehl, *g* nach Gram; die dickeren sind angeschwollene, vor der Keimung stehende.

Fig. VI. Keimstäbe (6—7 Stunden). *a* Methylenblau, *c* Fuchsin, *b* nach Ziehl (in VI *c* Vakuolen).

Fig. VII. Ruhestäbe (30 Stunden). *a* lebend mit Jodjodkalium behandelt, das Glykogen rotbraun. Die übrigen fixiert. Das Glykogen, welches sich schlecht färbt, ist durch die helleren Stellen angedeutet (*b—p*); *e—g* und *k—m* in Kanadabalsam: *n—p* nach Gram gefärbt.

Fig. VIII. Sporangien (ca. 50 Stunden). *a* Fuchsin-, *b—g* Methylenblaufärbung.

Fig. IX. Degenerationsformen. *a* und *b* jüngere Stadien: *a* mit Fuchsin, *b* mit Methylenblau gefärbt. *c—i* andere Formen: *c—e* in Fuchsin-, *f—i* in der Gram'schen Färbung. *i* Gram-Färbung + Fuchsin (Plasma blauschwarz, Membran rot). *k* stellt ein unbekanntes, aus Pferdekot isoliertes Bakterium dar, das infolge Glykogengehaltes (hell gefärbter, mittlerer Abschnitt) eine bipolare Färbung zeigt. *l—o* ältere Degenerationsformen, Fuchsinfärbung.

3) Der Thimotheebacillus.

Fig. X. *a* junge Stadien ungefärbt, *b* junge und ältere, mit Jodjodkalium behandelt, *c* Fett mit Sudan gefärbt, bei 4, 5 und 6 Plasma mit Methylenblau gefärbt. Von *d* ab fixiertes Materal: *d* mit Methylenblau gefärbt und zwar 1—4 jüngeres, wenige Tage altes, 5 und 6 dagegen etwa 8 Tage altes. Fig. X *e* 1—5 stellt mit einfachem Fuchsin gefärbte, *e* 6 und 7 mit Karbolfuchsin und *e* 8—15 nach Ziehl gefärbte Stäbchen verschiedenen Alters dar. Fig. X *f* 1—3 zeigt ältere Stäbchen (12—20 Tage alt) nach derselben Methode gefärbt; die Fetttropfen haben die weißen Lücken verursacht. Fig. X *f* 4 zeigt 2 in Kanadabalsam liegende ebenso gefärbte Stäbchen. In Fig. X *f* 5 und 6 sind ebenfalls zwei ältere Stäbchen abgebildet und zwar ist *f* 5 mit Sudan, *f* 6 nach Ziehl gefärbt. Fig. X *g* 1—3 zeigt Färbung nach Gram, in *g* 3 Gegenfärbung des Fettes mit Sudanlösung. Fig. X *h* 1, 2 und 3 soll zeigen, daß die weißen Lücken aus Fetttropfen hervorgegangen sind.

Tafel II.

Fig. XI. B. alvei (18 Stunden). *a* ungefärbt, *b* mit Methylenblau, *c* mit Methylenblau + Bismarckbraun gefärbt.

Fig. XII. Spirillum volutans (mit Ausnahme von *b*, *c* und *d* 3 Tage alt). *a* frisch, mit Sudan sind die Fetttropfen rot, die Volutanskugeln nicht gefärbt. *b* 14 Tage alt, große Volutanskugeln, *c* ebenfalls. b^2 und c^2 nach Zusatz von Methylenblau. *d* 10 Stunden alt: Methylenblau-Sudan. *e* 3 Tage alt: Methylenblau 1 + 10. *f* Spirillum gefärbt mit Methylenblau und dann gequetscht. *g* erst gequetscht und dann gefärbt. *h* Methylenblau + Bismarckbraun. i^1 in Karbolfuchsin erhitzt. Die roten Kugeln werden nach Zusatz von Methylenblau wieder blau: i^2 und lösen sich nach Zusatz von Natriumkarbonat: i^3. *k* mit Bismarckbraun erhitzt. *l* mit Hämatoxylin 24 Stunden kalt gefärbt. *m* nach 24-stündiger Behandlung mit Kernschwarz, Fett durch Sudan gefärbt, Cytoplasma durch Methylenblau. *n* verschiedene Stadien der Färbung nach Zusatz von Anilinwassergentianaviolett. *o* Karbolfuchsinfärbung + 5-proz. Schwefelsäure. *p* 4 Tage in 0,5-proz. Salzsäure, + Methylenblau, + Gelblösung. *q* 5 Minuten in Wasser auf 90° erhitzt, + Methylenblau, + Jodjodkalium. *r* 2 Stunden in absolutem Alkohol, + 5 Minuten in Wasser auf 80—85° erhitzt, + Karbolfuchsinfärbung, + Methylenblau.

Fig. XIII. Pseudomonas spec. *a* 5 Stunden alt, Methylenblau. *b* desgl., Methylenblau + Jodjodkalium. *c* desgl., Fuchsin. *d* 24 Stunden alt, Methylenblau 1 + 10. *e* 3 Tage alt, Methylenblau-Sudan. *f* Sudan-Jodjodkalium. *g* 7 Tage, Methylenblau-Sudan. *h* Karbolfuchsin heiß. *i* Methylenblau + Jodjodkalium. *k* dasselbe gequetscht.

Fig. XIV. B. cyanogenus. *a* 20 Stunden, Methylenblau (Löffler). *b* 50 Stunden, desgl. *c* Formolmethylenblau. *d* Fuchsin: d^1 + Methylenblau: d^2 + Fuchsin: d^3. *e* Methylenblau + 1-proz. Schwefelsäure (3 Stunden).

Fig. XV. B. alvei. *a* Keimstadien, Methylenblau. *b* in der Entwickelung zurückgebliebene Keimstadien: b^1 Methylenblau, b^2 dasselbe + Bismarckbraun, b^3 Karbolfuchsin heiß + 1-proz. Schwefelsäure. *c* Ruhestäbe und junge Sporangien, Methylenblau. *d* ältere Sporangien, Methylenblau. *e* Sporangium ohne Volutanskugeln, Methylenblau + Bismarckbraun.

Fig. XVI. B. fusiformis. Ruhestäbe und Sporangien, Methylenblau.

Fig. XVII. B. asterosporus. *a* 18 Stunden, Methylenblau. *b*—*k* Ruhestäbe, jüngere und ältere Sporangien, Methylenblau. *l'* junges Sporangium mit Sporenvakuole und Kern (Formolfuchsin), *l''* dasselbe Objekt mit Methylenblau nachgefärbt, *l'''* dasselbe nach der Methylenblaufärbung mit Jodjodkalium behandelt (Unterscheidung zwischen Kern und Volutanskugeln); *m* ein anderes Sporangium ebenso behandelt.

Fig. XVIII. Diphtheriebakterien (Pferdeblutserumkultur). *a*—*c* und *f* Normalformen, 16 Stunden alt, *d* mit Verzweigung, *e* und *g* degenerierte Formen mit keuligen Enden (*a*—*e* mit Methylenblau, *f* und *g* mit Methylenblau + Jodjodkalium behandelt), *h* und *i* Fäden mit abgeschnürten Kurzstäbchen aus 3 Tage alter Kultur, *k*—*o* Kurzstäbchen aus 5 Tage alter Kultur (Methylenblau).

Ueber eine neue Sarcina, die im Eiter gonokokkenähnliche Degenerationsformen zeigt.

[Aus der chirurgischen Abteilung des Krankenhauses der Jüdischen Gemeinde zu Berlin.]

Von Dr. **J. Nagano.**

Mit 1 Tafel und 6 Figuren.

Die Gonokokken sind nach ihrem Entdecker Neisser „verhältnismäßig große, etwas ovale Mikrokokken, die selten einzeln, fast durchgängig zu zweien, vorkommen, dicht aneinanderliegend, dabei sich gegenseitig leicht abplattend, semmelförmig aussehen, stets Haufen, nie Ketten bilden, in der freien Flüssigkeit oder häufiger an den Zellkörper der Eiterkörperchen und Epithelien gebunden vorkommen“ und „sich durch diese Merkmale von anderen unzähligen pathogenen und nicht patho-

genen Arten unterscheiden, so daß dieselben sogar diagnostisch verwertbar sind". Letztere Ansicht wird von Bokai[1]), Hirschberg[2]), Bumm[3]) u. A. nicht geteilt, indem ersterer ausdrücklich angiebt, daß die Mikrokokken, die er als die Kontagien der Gonorrhöe auffaßt, weder in der Form und Größe, noch in den sonstigen Eigenschaften von anderen Blennorrhöe nicht erzeugenden Mikrokokken differieren. Eklund[4]) glaubt auch den Gonococcus als für den Tripper allein spezifisch nicht betrachten zu dürfen, weil er bei akuten und chronischen Eiterungsprozessen in Lungen und Darm, bei ulceröser Stomatitis u. s. w. ganz ähnliche, wahrscheinlich identische Organismen gefunden hat. Bockhart und Bumm[5]) haben in den Sekreten der weiblichen Genitalien, bei blennorrhoischer Entzündung des unteren Teiles der Mastdarmschleimhaut, in dem Belage diphtheritisch gewordener Puerperalgeschwüre, bei ulcerösen Prozessen in der Mundhöhle, in einem Präparate von Sputum eines Keuchhustenkranken u. s. w. die semmelförmigen Diplokokken gesehen. Daraus schloß Bumm: Die Diplokokkengestalt, also die von Neisser hervorgehobene Semmelform, ist für den Gonococcus nicht charakteristisch, sondern es giebt noch andere pathogene und nicht pathogene Diplokokken, welche von den Tripperpilzen auch mit den besten Instrumenten dem Aussehen nach nur schwer und zum Teil gar nicht unterschieden werden können und sogar jene feineren Formeigentümlichkeiten, wie die leichte Einziehung an den zugekehrten Flächen der beiden Hemisphären aufzuweisen haben. Ebensowenig wie in der Form besitzen wir in der Größe des Gonococcus ein brauchbares Kennzeichen, indem einerseits bei diesem selbst die Ausbildung beträchtlich schwankt, andererseits andere Diplokokkenarten ganz dieselben Größenverhältnisse darbieten können. Auch die Reaktion auf die Farbstoffe ist bei den meisten Diplokokkenarten die nämliche, wie beim echten Gonococcus. Eine Ausnahme macht nur der gelbweiße Diplococcus, welcher nach der Gram'schen Methode, mit Jodjodkalilösung behandelt, den Farbstoff festhält und sich dadurch vom Gonococcus wesentlich unterscheidet. Matzuschita teilte mir mit, daß semmelförmige, den Gonokokken ähnliche Diplokokken sehr verbreitet sind; er hat solche auf der Haut, in den Thränen, im Kot, sogar im Staube und in der Luft öfters gesehen.

Wie viele Forscher erwähnt haben, ist eine auf die Form und Größe des einzelnen Pilzindividuums gegründete Unterscheidung nur wenig zuverlässig. Was zunächst die Form anbelangt, so zeigen ausgebildete Gonococcus-Exemplare bei gelungener Tinktion jene von Arning[6]) mit Recht hervorgehobene Konkavität an den zugekehrten Flächen der beiden Hälften, die von mehr scheibenartiger Gestalt und voneinander durch einen etwas breiteren Spalt getrennt sind; durch das schlankere Aussehen, das sie dadurch gewinnen, können sie von den

1) Bokai, Ueber das Kontagium der akuten Blennorrhöe. (Centralbl. f. d. med. Wissensch. 1880. p. 74.)

2) Hirschberg, J. und Krause, F., Zur Pathologie der ansteckenden Augenkrankheiten. (Centralbl. f. prakt. Augenheilk. 1881.)

3) Bumm, Beitrag zur Kenntnis der Gonorrhöe der weiblichen Genitalien. (Arch. f. Gynäkol. Bd. XXIII. p. 327.) — Der Mikroorganismus der gonorrhoischen Schleimhauterkrankungen. Wiesbaden 1887.

4) Eklund, Referat von Schmidt's Jahrbüchern. Bd. CXCVII. p. 139.

5) Bockhart und Bumm, s. o.

6) Arning, Ueber das Vorkommen von Gonokokken bei Bartolinitis. (Vierteljahrsschr. f. Dermatol. u. Syphilis. 1883. Heft 2. p. 371.)

gonokokkenähnlichen Diplokokkenarten, deren Zwischenspalt schmäler ist und deren Hälften sich mehr der Halbkugelform nähern, auch im Einzelexemplar unterschieden werden, zumal wenn man an Reinkulturen das Auge für diese feinen Formdifferenzen geübt hat. Wo es sich dagegen um nicht sehr gut ausgebildete Exemplare handelt, da wird es auch mit den besten Instrumenten schwer oder unmöglich, einen sicheren Entscheid zu treffen. Die Größe der Gonokokken ist zur Differenzierung nicht zu benutzen, weil sie je nach dem Stadium der Entwickelung bedeutend variiert.

Wie bereits erwähnt, sind die Gonokokken durch eine Fähigkeit ausgezeichnet, welche allen der Form nach ähnlichen Arten abgeht; sie vermögen in das lebende Zellprotoplasma einzudringen, sich daselbst zu vermehren und jene rundlichen Anhäufungen um die Kerne zu bilden, wie sie sich bei anderen Diplokokken in dieser Weise niemals vorfinden. E. Fränkel[1]) hat im eiterigen Vaginalsekrete bei Kindern Diplokokken gefunden, welche außer in der Form und Größe auch in ihrem Verhalten zu den Zellen vollständig übereinstimmten. Die gonorrhoische Natur der Erkrankung schloß Fränkel deswegen aus, weil sich eine Infektion nicht nachweisen ließ. Kroner[2]) hat jedoch im Gegensatze zu Tischendorf[3]), welcher die Fränkel'schen Fälle ebenfalls erwähnte, mit Recht bemerkt, daß solche Infektionen bei Kindern auf oft sehr unglaubliche Weise gesetzt werden können. In der That sind solche Häufchen, wenn man wirklich Gonokokken vor sich hat, immer anzutreffen, aber in jedem Falle nicht gleich zahlreich und manchmal spärlich.

Es sind diese Angaben hier deshalb von besonderem Interesse, weil gerade für unsere Zwecke auf eine sichere Differenzierung des Gonococcus alles ankommt. Im gonorrhoischen Eiter sind die Gonokokken so sehr die einzig vorkommende Mikroorganismenform, daß die gleichzeitige Beobachtung anderer Arten neben dem Gonococcus zu den größten Seltenheiten gehört und wohl nie zu diagnostischen Irrtümern Veranlassung giebt. Zu sicherer Diagnose sind gute Präparate, sichere Technik und gute Immersionsinstrumente da noch mehr nötig, als dies Neisser schon für die Untersuchung des Harnröhrentrippers gefordert hat.

Nach der Feuerprobe von zahlreichen Autoren kann man jetzt ziemlich leicht von ähnlichen Diplokokken die Gonokokken auseinander halten, sogar durch Bockhart[4]) Gonokokken reinkultivieren.

Unsere jetzigen Merkmale zur Diagnose zwischen Gonokokken und gonokokkenähnlichen Diplokokken sind folgende:

1) In nach Gram gefärbten mikroskopischen Präparaten sind fragliche Kokken sehr gut gefärbt, während Gonokokken allein sich entfärben. Die Gonokokken kommen häufig an den Zellkörper der Eiterkörperchen und Epithelien gebunden vor, während anderen formähnlichen Arten meist diese Fähigkeit abgeht.

2) Die Isolierung und Reinzüchtung des fraglichen Coccus gelingt

---

1) Fränkel, Deutsche med. Wochenschr. 1885. p. 22 u. Virch. Arch. Bd. XCIX. 1885. p. 251.

2) Kroner, Zur Aetiologie der Ophthalmoblennorrhoea neonator. (Archiv für Gynäkol. Bd. XXV. p. 109.)

3) Tischendorf, Arch. f. Gynäkol. Bd. XXV. p. 114.

4) Bockhart, Beitrag zur Aetiologie und Pathologie des Harnröhrentrippers. (Vierteljahrsschr. f. Dermatol. u. Syphilis. 1883. Heft 1.)

sehr leicht, da er bei gewöhnlicher Zimmertemperatur gut wächst und bezüglich seines Nährbodens durchaus nicht wählerisch ist. Dagegen wächst der Gonococcus nur bei Brüttemperatur auf bestimmten Nährsubstraten.

Da die Züchtung des Gonococcus sehr umständlich und nicht leicht ist, macht man gewöhnlich, um Gonokokken zu diagnostizieren, nur ein Eiterstrichpräparat, behandelt es nach Gram und stellt die Diagnose auf Gonokokken, wenn die Diplokokken sich entfärben.

Bei einer Reihe von Untersuchungen des gonorrhoischen Eiters habe ich aus einem Eiter von Ovarialabsceß eine nach Gram entfärbbare Sarcina gefunden, welche im Eiter gonokokkenähnliche Degenerationsform zeigt und wohl zu diagnostischen Irrtümern Veranlassung geben kann. Ich nahm daraus Veranlassung, das morphologische und biologische Verhalten der hier zufällig gefundenen Sarcina festzustellen, da mir dies für die klinische Diagnose des Gonococcus wertvoll zu sein schien.

Der Eiter stammt von einer Patientin F., die an Ovarialabsceß leidet und am 17. Januar 1902 von Herrn Prof. Israel operiert worden ist. Der Befund bei der Operation war kurz wie folgt: Rechts neben dem Uterus ein faustgroßer Sack, über den die verdickte Tube hinwegzieht. Am ovarialen Ende der Tube zeigt sich innerhalb des Peritoneums etwas Eiter. — Das exstirpierte Präparat zeigt einen zusammenhängenden, aus Tuben und Ovarium bestehenden Eitersack mit verdickter Wand.

Da ich hoffte, in diesem Eiter den Gonococcus nachzuweisen, nahm ich Färbungen desselben mit Gentianaviolett, Jodjodkali und Alkohol (Gram'sche Methode), sowie Bismarckbraun vor. In diesen Deckglaspräparaten des Eiters sieht man folgendes:

Zunächst zahlreiche Eiterkörperchen. Neben diesen liegen zahlreiche, ziemlich kleine Kokken, welche sich nach Gram entfärben. An keiner einzigen Stelle stehen sie in irgend einem Verhältnis zu den Eiterzellen, sie liegen nicht in diesen, nur selten auf denselben. Was die Anordnung der Kokken anbelangt, so liegen sie meist zu zweien (Diplokokken) oder Tetraden, oft in Haufen, sehr selten allein (Monokokken). Diplokokken erscheinen oft wie Gonokokken, d. h. semmelförmig. Außerdem sind noch nach Gram gut gefärbte, mittelgroße, runde Mikrokokken, in ziemlich langen Ketten angeordnete Streptokokken und vereinzelt Sarcina vorhanden. Die nach Gram entfärbbaren Diplokokken schienen mir Gonokokken zu sein, weil nach Gram entfärbbare, semmelförmige Diplokokken außer den Gonokokken noch nicht bekannt sind. Ich machte deshalb gleich die Kiefer'sche Nährboden- und mit Menschenblut gestrichene Agarplattenstrichkultur und fand am nächsten Tage neben einigen Mikrokokkenkolonieen verhältnismäßig viele, kleine, hauchartige Kolonieen, welche bis zu einem gewissen Grade denen der Gonokokken ähnlich waren, im mikroskopischen Präparate jedoch nach Gram entfärbbare Sarcina zeigten. Da nach meinem Wissen nach Gram entfärbbare Sarcina in der Litteratur noch nicht beschrieben worden ist und außer dieser Sarcina keine anderen Mikrokokken, welche nach Gram sich entfärbten, sich auf der Plattenkultur entwickelten, trotzdem solche im Eiter vorhanden waren, beschloß ich, in meiner Untersuchung noch weiter zu gehen, und ich gewann mir die gütige Beihilfe meines Kollegen Dr. med. et phil. T. Matzuschita,

dem ich dafür zu größtem Danke verpflichtet bin. Bei unseren gemeinschaftlichen wiederholten Untersuchungen waren wir bemüht:

1) Plattenstrichkultur auf Blutserum und Nähragar mit oder ohne Menschenblut, Kiefer- und Wassermann'sche Nährböden, sowie Gußplattenkultur von gewöhnlichem Nähragar, 2-proz. Traubenzuckeragar, 5-proz. Glycerinagar und 10-proz. Nährgelatine, ferner eine hohe Schichtkultur von 2-proz. Traubenzuckeragar nach Liborius zu machen;
2) die Eigenschaften aller auf den Platten entwickelten Mikroorganismen zu untersuchen;
3) Impfung an Tieren anzustellen.

Was das Resultat aller meiner Plattenkulturen anbelangt, so gelang es mir, auf allen Platten nur ein paar große, runde, gelbe oder weiße Kolonieen, außerdem auf Serum mit Menschenblut, Kiefer- oder Wassermann'schen Nährböden noch zahlreiche, kleine, dünne, isolierte, hauchartige, grauweiße Kolonieen nachzuweisen. Die hohe Schichtkultur von Traubenzuckeragar blieb steril. Das mikroskopische Präparat zeigte, wie schon erwähnt, daß diese kleinen hauchartigen Kolonieen, welche ich für Gonokokkenkolonieen hielt, Sarcinen waren. Andere auf gewöhnlichen Nährböden entwickelte Kolonieen waren Sarcina lutea, Sarcina alba, Sarcina flava, Micrococcus pyogenes aureus und Micrococcus pyog. albus. Streptokokken und semmelförmige Diplokokken haben sich überhaupt gar nicht entwickelt. Die zuerst genannten Sarcinen färben sich nach Gram gar nicht, während andere Sarcinen und Mikrokokken sehr gut und intensiv gefärbt werden. Wie bereits oben erwähnt, haben wir in mikroskopischen Eiterpräparaten nach Gram gefärbte Mikrokokken, Sarcinen und nach Gram entfärbte Kokken, aber keine nach Gram entfärbten Sarcinen gesehen. Es erhob sich daher die Frage, ob die im Eiterpräparate nach Gram entfärbten Diplokokken auf der Platte sich überhaupt nicht entwickelt hatten, und ferner, ob und woher die auf Platten entwickelte, nach Gram entfärbbare Sarcina gekommen war. Es liegt nahe, die Frage so zu beantworten, daß sich die im Präparate gesehenen Diplokokken auf der Plattenkultur überhaupt gar nicht entwickelt hatten und daß die auf der Plattenkultur entwickelten Sarcinen etwa aus der Luft zufällig hineingekommen waren oder daß die fraglichen Kokken und Sarcinen miteinander identisch sind.

Um dies zu beweisen, untersuchte ich zunächst, ob diese Sarcinen miteinander im Eiter die Formen verändern und gonokokkenähnliche Formen zeigen können.

Versuch 1. Eiter aus Absceß, welcher makroskopisch sehr dickflüssig, grüngelb ist, mikroskopisch neben Blutkörperchen und zahlreichen Eiterzellen hier und da ein paar nach Gram gefärbte Mikrokokken aufweist, die sich kulturell als M. pyogenes aureus erweisen. Setzt man diesem Eiter von ca. 5 ccm eine Oese Sarcina aus Reinkultur zu, so vermehrt sich die Sarcina bei 37° C sehr langsam und schwach. Nach mehr als 5 Tagen beobachtet man außer dem Eitercoccus spärliche, nach Gram entfärbbare Kugeln und ein paar Sarcinen, während nach 1—4 Tagen nur nach Gram entfärbbare Sarcinen in geringer Anzahl vorhanden sind. Nach 15 Tagen findet man auf Plattenkultur des Eiters neben Eiterkokkenkolonieen auch Sarcina-Kolonieen.

Versuch 2. Eiter aus Osteomyelitis, welcher makroskopisch mäßig dickflüssig ist und mikroskopisch und in Kultur nur den M. pyogenes aureus und albus enthält. Mit 5 ccm dieses Eiters wird eine Oese Sarcina vermischt und das Ganze bei 37° C aufbewahrt; nach 5 Tagen findet man in geringer Menge nach Gram entfärbbare, kleine, runde Kugeln, meist in Diplokokkenform neben braungefärbten Sarcinen und blaugefärbten Eiterkokken vor. Nach 10 Tagen ist die Entwickelung der Sarcinen auf Plattenkulturen nachweisbar.

Versuch 3. Eiter aus Osteomyelitis, welcher nur den M. pyogenes albus enthält. In mit Sarcina gemischtem Eiter findet man nach 1—5 Tagen immer nur braungefärbte Sarcina und violettgefärbte Eiterkokken und keine nach Gram entfärbbaren Diplokokken vor.

Versuch 4. Eiter aus Osteomyelitis, welcher makroskopisch wenig Blut und mikroskopisch Eiterzellen, Blutkörperchen und spärliche Kokken enthält, die sich auf Plattenkultur als M. pyogenes aureus und albus erweisen. In diesem mit Sarcina gemischten Eiter findet man ebenfalls nach 1—5 Tagen nur braungefärbte Sarcina und violettgefärbte Kokken.

Versuch 5. Eiter aus Periproktalabsceß, welcher viel Blut enthält. In diesem Eiter bildet die Sarcina erst nach 4 Tagen geringe Degenerationsformen, d. h. nach Gram entfärbbare Diplokokken, während sie am 1.—3 Tage immer typische Sarcina-Form zeigt. Auf Plattenkultur ist die Entwickelung der Sarcina ebenfalls nachweisbar.

Versuch 6. Eiter aus Drüseneiterung, welcher nur Eiterzellen und Eiterkokken enthält. In diesem Eiter zeigt die Sarcina nach 6 Tagen die Degenerationsform.

Versuch 7. Eiter aus einem Karbunkel, welcher sehr viel Blut enthält. Bis zum 15. Tage zeigt die Sarcina eine normale Form, nur selten sind etwa nach 4 Tagen vereinzelte, mit Bismarckbraun gefärbte Diplokokkenformen nachweisbar.

Aus den oben beschriebenen Versuchen ersehen wir folgende zwei Thatsachen:

1) Im Eiter vermehren sich die Sarcinen sehr schwach.

2) Im Eiter zeigen die Sarcinen nach gewisser Zeit oft, doch in geringer Anzahl eine Formveränderung, d. h. sie bilden kleine Kugeln, welche zu zweien, zu Tetraden, manchmal in Haufen und allein angeordnet sind.

Es scheint mir, daß der Eiter nicht genug Nährstoff für Vermehrung der Sarcina enthält, daß in mit anderer Nährflüssigkeit verdünntem Eiter die Sarcinen sich noch mehr vermehren und zahlreiche Degenerationsformen zeigen. Nach dieser Vermutung stellte ich folgende Versuche an:

Versuch 8. Eiter aus Osteomyelitis, dessen Stamm mit dem des Eiters von Versuch 4 identisch ist. In mit Bouillon verdünntem Eiter (5 Teile Eiter und 5 Teile Nährbouillon) fand man nach 20 Stunden zwischen Eiterkokken und Sarcina braungefärbte Diplokokken. Säte man eine 3 Tage alte Kultur auf die Agarplatte, so entwickelte sich nur die Sarcina und M. pyogenes aureus, sowie albus.

Versuch 9. Eiter aus Osteomyelitis, dessen Stamm mit dem des Eiters von Versuch 3 identisch ist. In mit derselben Quantität der Bouillon verdünntem Eiter bilden sich erst nach 3 Tagen die Degene-

rationsformen, während bis zum 2. Tage immer nur Sarcina und Eiterkokken vorhanden sind.

Versuch 10. Eiter aus dem Absceß, welcher bei Versuch 1 benutzt wurde. In mit Bouillon verdünntem Eiter (3 Teile Eiter, 10 Teile Nährbouillon) findet man schon nach 24 Stunden zahlreiche nach Gram entfärbbare kleine Kokken zwischen braungefärbter Sarcina und violettgefärbten Mikrokokken. Nach 15 Tagen entwickeln sich die Sarcinen auf Plattenkultur zwischen Kolonieen von Eiterkokken. Diplokokken, welche nach Gram entfärbbar sind, wurden niemals auf Plattenkultur nachgewiesen (vergl. Tafel, Fig. 1).

Versuch 11. Eiter aus Osteomyelitis, dessen Stamm mit dem des Eiters von Versuch 2 identisch ist. In mit Bouillon verdünntem Eiter (3 : 10) fand man nach 1—4 Tagen immer nur braungefärbte Sarcina und violettgefärbte Eiterkokken und erst nach mehr als 5 Tagen die Degenerationsform der Sarcina. Dieselbe ist nach 7 Tagen zwischen Sarcina und Eiterkokken ziemlich reichlich nachweisbar; auf Plattenkultur entwickelt Diplococcus sich nicht, sondern nur Sarcina und Eitercoccus.

Versuch 12. Eiter aus Osteomyelitis, dessen Stamm mit dem des Eiters von Versuch 3 identisch ist. In mit Bouillon verdünntem Eiter (2,5 : 10) vermehren die Sarcinen sich schnell und bilden schon nach 20 Stunden die Degenerationsformen.

Versuch 13. Eiter aus Hirnabsceß. Dieser Eiter enthält mikroskopisch nur Eiterzellen und M. pyogenes albus. In dem mit ca. 6mal soviel Bouillon verdünntem Eiter bilden sich erst nach 5 Tagen zwischen Sarcina und Eiterkokken Degenerationsformen, während sich in 1–4 Tagen immer typische Paketformen zeigen.

Versuch 14 und 15. Eiter aus Osteomyelitis, dessen Stamm mit dem des Eiters von Versuch 3 identisch ist. In 8- und 10mal verdünnter Eiterbouillon bilden sich schon nach 20 Stunden geringe, nach 3 Tagen ziemlich viele Degenerationsformen. Auf Plattenkultur entwickelt sich nur Sarcina und Eitercoccus.

Versuch 16. Eiter aus Osteomyelitis, dessen Stamm mit dem des Eiters von Versuch 2 identisch ist. In ca. 20mal verdünnter Eiterbouillon findet man nach 2 Tagen zwischen braungefärbten Sarcinen und violettgefärbten Eiterkokken in geringer Menge vorhandene, nach Gram entfärbbare, braungefärbte kleine Kokken, welche nach 6—7 Tagen sich etwas vermehren. Plattenkultur mit diesem gemischten Eiter wie vorhergehend.

Versuch 17. Eiter aus Osteomyelitis, dessen Stamm mit dem des Eiters von Versuch 4 identisch ist. In ca. 20mal verdünnter Eiterbouillon tritt erst nach 3 Tagen die Bildung der Degenerationsform ein.

Hieraus ersehen wir, daß nach Gram entfärbbare, den Gonokokken ähnliche Kugeln in Eiterbouillon viel schneller und üppiger als in reinem Eiter sich bilden können. Diese Versuche beweisen aber noch nicht, daß diese eigentümlichen Formen Degenerationsformen von Sarcinen sind, weil es sich auch um Eiterkokken handeln könnte, die sich nach Gram entfärben, oder um Protoplasma von Eiterzellen. Um diese Frage klar zu machen, untersuchte ich 15 Tage lang täglich 3 verschiedene, bei 37° C stehende Eiterbouillon, welche mit denen der Versuche 8, 10 und 14 identisch sind, und 5 reine, nicht verdünnte Eiterarten ohne Sarcina und fand niemals fragliche, nach Gram entfärbbare kleine Diplokokken.

Hierdurch kann ich feststellen, daß Diplokokkenformen im Eiter zweifellos Degenerationsformen der Sarcina sind und daß diese Sarcina sich im Eiter zur Gonococcus-ähnlichen Form verändert.

Es erübrigt sich, noch festzustellen, ob die Formveränderung der Sarcina im Eiter eine Zersetzung ihrer Kittmasse durch Eiter zur Ursache hat oder ob es sich um eine neugespaltene Sarcina handelt.

Wie ich bereits erwähnt habe, sind im Eiter oder in der Eiterbouillon typische Sarcina-Formen neben Degenerationsformen vorhanden. Hieraus läßt sich ziemlich leicht erklären, daß die Kittmasse der Sarcina durch Eiter nicht zersetzt wird. Setzt man zu Serumstrichkultur der Sarcina den reinen periproktitischen Eiter (siehe Versuch 5) oder zu Glycerinagarstrichkultur den mit der Bouillon verdünnten (3 : 10) Absceßeiter (siehe Versuch 10), so findet man viel mehr Sarcina- als Degenerationsformen. Bei dem letzten Versuche waren Degenerationsformen schon nach 24 Stunden in geringer Anzahl vorhanden, während beim ersten Versuche bis zu 18 Tagen immer keine Degenerationsformen, sondern nur Sarcinen nachweisbar waren.

Endlich muß ich noch die Ursache der Degeneration der Sarcina sowie die Beziehungen zwischen der Formveränderung der Sarcina und den Eiterkokken festzustellen suchen. Um diese Frage zu beantworten, untersuchte ich folgendes:

Versuch 28—30. Setzt man zu 10 ccm Bouillon eine Oese von Sarcina-Reinkultur und Eiter, deren Stämme mit denen des Eiters von Versuch 1, 5 und 6 identisch sind, so wird die Bouillon durch die Entwickelung der Eiterkokken bald getrübt, die Sarcina wird jedoch durch dieselben in ihrem Wachstum nicht beeinflußt. In dieser Mischkultur findet man bis zum 15. Tage nur Eiterkokken und Sarcina, sehr selten nach 7 Tagen ein paar nach Gram entfärbbare kleine Kokken.

Versuch 31. In Mischkultur der Gelatine von Sarcina und Eiter, dessen Stamm mit dem des Eiters von Versuch 1 identisch ist, entwickeln sich die Sarcinen ebenfalls unbeeinflußt, bilden aber niemals Degenerationsformen.

Versuch der Mischkultur der Sarcina und des M. pyogenes aureus: Zur Kontrolle machte ich Untersuchungen mit Bouillonreinkulturen von Sarcina und M. pyogenes aureus. Bei beiden Reinkulturen fand ich bis zu 18 Tagen keine nach Gram entfärbbare Diplokokken.

Versuch 34. In der Bouillonmischkultur von Sarcina mit M. pyogenes aureus sind ebenso immer nur normale Formen vorhanden. Nach 17 Tagen entwickeln sich beide Mikroorganismen auf Plattenkultur zusammen.

Versuch 35. Sät man in 12 und 14 Tage alte Bouillonkultur der Sarcina, welche nur normale Formen zeigt, den M. pyogenes aureus, so findet man nach 6—16 Tagen neben normalen Sarcinen und Eiterkokken sehr selten große, runde, nach Gram entfärbbare Kugeln. Aus diesen 16 Tage alten Mischkulturen (d. h. also ca. 30 Tage alten Sarcina-Bouillonkulturen) entwickeln sich Sarcinen auf Plattenkultur gar nicht, sondern nur M. pyogenes aureus.

Versuch 36. Sät man in 1 Tag alte Bouillonkultur des M. pyo-

genes aureus die Sarcina, so sind nach 6 Tagen verkleinerte Sarcinen in geringer Anzahl zwischen M. pyogenes aureus vorhanden. Nach 16 Tagen sind beide Mikroorganismen kultivierbar.

Versuch 37. Setzt man in 4 Tage alte Traubenzuckerbouillonkultur der Sarcina eine Oese von Bacillus subtilis zu, so findet man nach 6—30 Tagen spärliche, mittelgroße, braungefärbte Diplokokken zwischen Sarcina und Stäbchen. Die Sarcina hat nach 30 Tagen noch Lebenskraft.

Aus den oben beschriebenen Beobachtungen ersehen wir, daß Sarcina mit Eiterkokken und Heubacillen zusammen sich unbeeinflußt fortpflanzt und in Mischkultur fast immer normale Sarcina-Formen, nur ausnahmsweise ein paar Gonokokken-ähnliche Formen zeigt. Hieraus kann man schließen, daß die Formveränderung der Sarcina im Eiter nichts mit den Eiterkokken zu thun hat, sondern der Einfluß des Eiters selbst jene Veranlassung bewirkt.

Im Schnittpräparate des an den Eiterherd grenzenden Gewebes, das 1 Monat lang in der Kaiserling-Flüssigkeit aufgehoben war, konnte ich meine Mikroorganismen nicht nachweisen.

Wir müssen nun die morphologischen und biologischen Eigenschaften dieser Sarcina kennen lernen.

Morphologie: Mittelgroße Zellen in Paketform. Es sind nicht bloß die Zellen verschiedener Kulturen sehr verschieden groß, sondern in ein und denselben Kulturen finden sich Pakete, deren Zellen im Durchmesser außerordentlich voneinander abweichen. Namentlich treten in Gelatinekultur bei 24° C neben Paketen von großen Zellen häufig Sarcina-Pakete auf, die fast halb so groß sind. Sarcina-Zellen sind in Bouillon etwas größer als auf gewöhnlichem Nähragar, Glycerinagar und Traubenzuckeragar mit oder ohne Menschenblut. Auf Blutserumstrichkultur findet man fast regelmäßig kleine Zellen, die fast halb so groß als auf Nähragar sind, während im flüssigen Serum immer große Zellen vorhanden sind. Auf den übrigen Nährböden, z. B. gekochtem Eiweiß, Eigelb, Kiefer'schen und Wassermann'schen Nährböden, bilden sich immer mittelgroße Zellen. Die Zellen ein und derselben Pakete sind fast immer gleich groß. Zwischen Paketen findet man selten einzelne Diplokokken aus kleinen oder großen Zellen; wie ich bereits erwähnt habe, bilden sie im Eiter, besonders in mit Bouillon verdünntem Eiter, kleine, semmelförmige, gonokokkenähnliche Diplokokken.

Eigenbewegung: Im hängenden Tropfen habe ich niemals Eigenbewegung, sondern ganz geringe molekulare Bewegung beobachtet.

Sporenbildung: In nach Gram'scher Färbungsmethode behandelten Präparaten fand man ziemlich oft in der Mitte der Zellen runde, bald große, bald kleine, nach Gram gut färbbare Körper. Diese Körper sind aber keine Sporen, weil sie bei der Sporenfärbungsmethode (mittels Ziehl'scher Fuchsinlösung, Säurealkohol und Nachfärbung von Methylenblau) nicht färbbar sind. Die 2—30 Tage alten Agarkulturen geben bei 65° C nach 30—60 Minuten, bei 80° C nach 10 Minuten, bei 90° C nach 5 Minuten, bei 95—100° C nach 2 Minuten zu Grunde. Hiernach kann man feststellen, daß diese Sarcina keine Sporen bildet

Färbbarkeit: Mit allen Anilinfarbstoffen färben sich die Sarcinen sehr gut; durch Behandlung mit Jodjodkali und Alkohol (Gram'sche Methode) sind dieselben entfärbbar, doch nicht immer gleichmäßig; man findet nämlich bisweilen in der Mitte der Zellen bald kleine, bald große, runde, nicht entfärbte chromatische Körper. Vergrößern sich diese, so färbt die Zelle auch nach Gram gut; man findet deshalb nicht selten in einem Sarcina-Paket entfärbte und gefärbte Zellen. Sarcinen aus Eiterkultur oder Tierkörper färben sich jedoch nie nach Gram (vergl. Tafel, Fig. 1 und 2).

Ansprüche an Temperatur, Nährböden und Sauerstoffbedürfnis: Bei 37° C wachsen die Sarcinen viel besser als bei 24° C. Bei 24° C entwickeln sie sich langsam, sogar auf Gelatine manchmal gar nicht. Auf gewöhnlichem Nähragar, Glycerinagar, Traubenzuckeragar und Rinderblutserum ohne oder mit Menschenblut, sowie auf Kiefer'schen Nährböden, in Bouillon, flüssigem Blutserum etc. entwickeln sie sich sehr üppig; besser auf solchen Nährböden, welche mit Menschenblut bestrichen sind, während in Kartoffeln und in Milch kein Wachstum stattfindet. In der hohen Schichtkultur von Traubenzuckeragar entwickeln sich die Kolonieen nur auf der Oberfläche des Agars, in der Tiefe gar nicht, also sind sie obligat aërob.

Gelatineplattenkultur: Auf Gelatine entwickeln sie sich bald langsam, bald gar nicht. Man bemerkt erst nach 8 Tagen makroskopisch kleine, weiße, runde Kolonieen, welche allmählich und sehr langsam die Gelatine verflüssigen. Bei schwacher Vergrößerung erscheinen die Kolonieen als rundlich gestaltete Scheiben, die graue Farbe und einen scharf konturierten Rand erhalten. Sie zeigen ein feinkörniges Gefüge und werden gegen die Mitte zu dunkler. Der Rand wird unglatt und durchscheinend. Beginnt die Verflüssigung der Gelatine, so entsteht rings um die Bakterienmasse herum ein runder, klarer Hof (vgl. Fig. 1 im Text).

In Gelatinestichkultur entsteht nach 10 Tagen bei 24° C schalenförmige Verflüssigung mit Luftblase. Die Verflüssigung schreitet sehr langsam nach abwärts, so daß die Gelatine nach etwa 3 Wochen 1 ccm tief verflüssigt ist. Am Verflüssigungsgrunde befindet sich ein grauweißes Sediment; die darüber befindliche dickflüssige Gelatine ist klar, trägt keine Haut. Längs des Stichkanals erfolgt das Wachstum fast gar nicht.

Gewöhnliche Nähragarplattenkultur: Bei 37° C zeigen die Kolonieen sich auf der Oberfläche des Nähragars nach 1—2 Tagen in 2 verschiedenen Formen, nämlich immer sehr klein bleibend, grau, dünn oder in runden, scharf konturierten, gräulich-weißen, halbkugeligen, feucht glänzenden Häufchen von 1—3,5 mm Durchmesser. Später werden die Kolonieen glanzlos, mattgrau; die Oberfläche derselben ist nicht glatt und sie zeigen 1—3 oder noch mehrere kleine Körnchen, manchmal von pocken- oder nabelähnlicher Gestalt. Bei schwacher Vergrößerung sind die Kolonieen rund, gelblichgrau, braun gefärbt, ziemlich fein gekörnt, mit feinzackigem Rande und dunklerem Centrum. Nach der Mitte zu werden sie allmählich dunkel. Die zuerst beschriebenen, immer klein bleibenden Kolonieen sind mikroskopisch sehr durchsichtig und hellgrau. Die Kolonieen entwickeln sich regelmäßig nur auf der Oberfläche der Nährböden, auch direkt unter der Oberfläche, um aber dann in den nächsten Tagen schon an die Oberfläche zu gelangen. Solche in Agar eingeschlossene Kolonieen erscheinen erst länglich oval

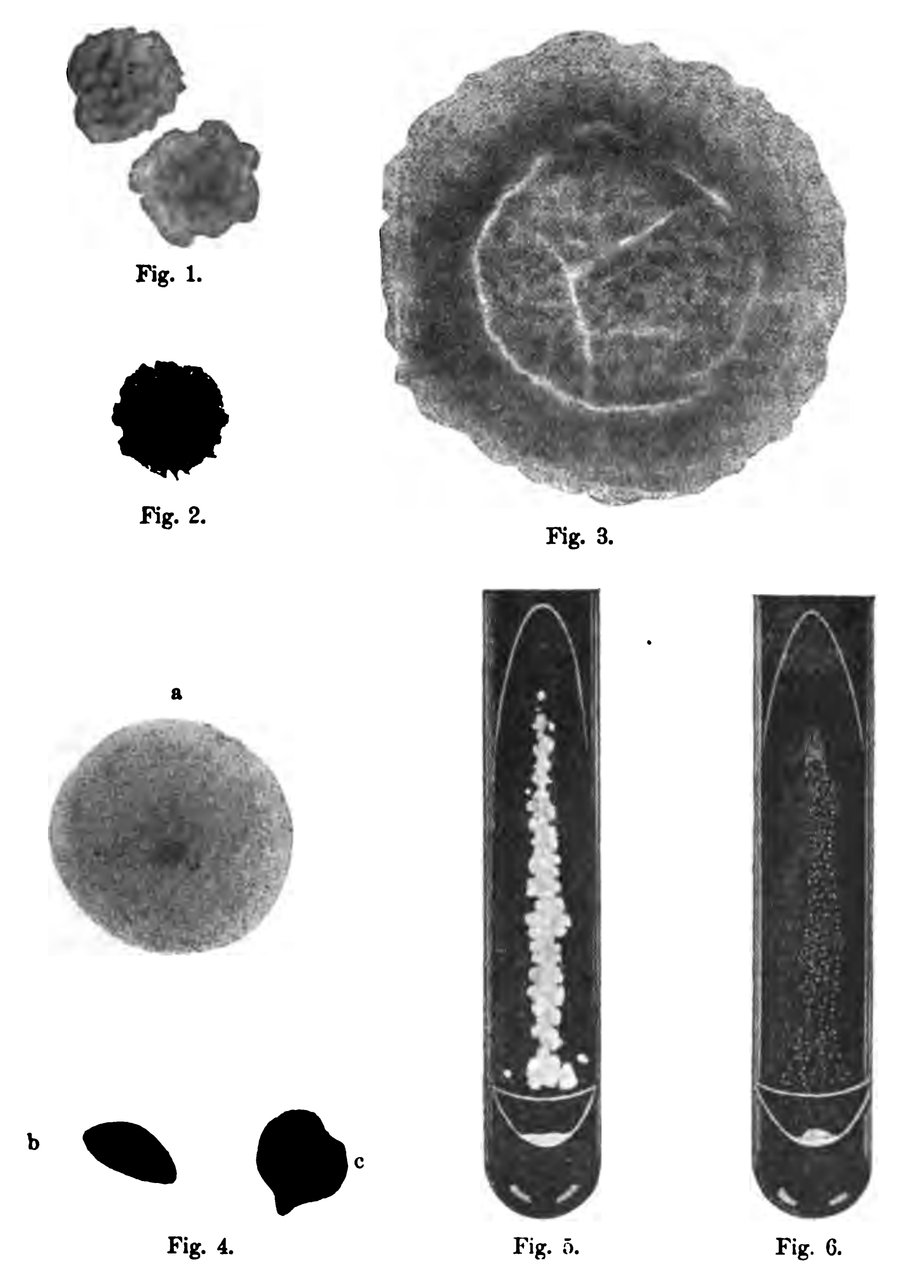


Fig. 1. Fig. 2. Fig. 3. Fig. 4. Fig. 5. Fig. 6.

Fig. 1. Kolonieen auf Gelatineplatte 8 Tage bei 24° C. Vergr. 1 : 60.

Fig. 2. Eine Kolonie auf Blutserumplatte; stets klein bleibend, hauchartig; das Blutserum ist noch nicht erweicht. 2 Tage alt bei 37° C. Vergr. 1 : 60.

Fig. 3. Eine auf Blutserumplatte entwickelte Kolonie, welche sich schnell vergrößert hat; das Blutserum ist schon erweicht. 2 Tage alt bei 37° C. Vergr. 1 : 60.

Fig. 4a. Eine oberflächliche Kolonie auf 2-proz. Traubenzuckeragarplatte; b c unter der Oberfläche des Agars liegende Kolonieen, welche bald an die Oberfläche gelangen werden. 2 Tage alt bei 37° C. Vergr. 1 : 60.

Fig. 5. Eine Nähragarstrichkultur; 2 Tage bei 37° C. Natürliche Größe.

Fig. 6. Eine Blutserumstrichkultur; 2 Tage bei 37° C. Natürliche Größe.

oder herzförmig und gleichmäßig dunkel; gelangen sie an die Oberfläche, so werden sie wieder hellbraungrau mit gut erkennbarer, feinkörniger Zeichnung und feinem Gefüge; der Kern bleibt immer dunkler als der Rand, der mit der Zeit vollständig durchsichtig wird. In tieferen Schichten entwickeln sich die Kolonieen überhaupt gar nicht (vgl. Fig. 4 im Text).

Agarstrichkultur: Auf schräg erstarrtem Agar bildet sich einmal nach 24 Stunden bei 37 ° C ein grauweißer, saftig glänzender, ziemlich dicker Belagstreifen, der nach Ablauf weiterer 3 Tage unten eine Ausdehnung von 8 mm, an der Spitze nur eine solche von 1 mm erreicht. Der Rand ist regelmäßig gekerbt, scharf konturiert; später lassen sich einzelne deutliche Körnchen, selten Querfalten auf dem Belage erkennen; zuweilen ist er trocken, glanzlos und gelblich gefärbt. Ein anderes Mal zeigen sie nur sehr kleine, isolierte, graue Kolonieen. Das Kondensationswasser ist klar oder sehr schwach getrübt unter Bildung des reichlichen, gräulich-weißen Sediments (vgl. Fig. 5 im Text).

Auf Glycerinagar, 2-proz. Traubenzuckeragar und Kiefer'schen Nährböden entwickeln sie sich ebensogut wie auf gewöhnlichem Nähragar. Auf verschiedenen Agarnährböden mit Menschenblut wachsen sie üppig; die Beschaffenheit der Kolonieen ist aber wie die auf gewöhnlichem Nähragar.

Blutserumplattenkultur: Auf mit oder ohne Menschenblut gestrichenem Blutserum entwickeln sie sich wie auf Nähragar, nach einiger Zeit wird das Blutserum aber allmählich und langsam erweicht oder verflüssigt. Die Erweichung des Blutserums zeigen die Kolonieen bei schwacher Vergrößerung erst nur in der Mitte; dann entstehen in der ganzen Kolonie Spalten oder Furchen, die an Schildpatt oder die schematische Zeichnung von dem Durchschnitt eines Leberacinus erinnern (vgl. Fig. 2 und 3 im Text).

Blutserumstrichkultur: Wie auf Blutserumplattenkultur (vgl. Fig. 6 im Text).

Bouillonkultur: Die gewöhnliche Nährbouillon trübt sich selten, anfangs sehr schwach, klärt sich aber bald wieder auf, meist bleibt die Bouillon klar. Am Boden setzen sich reichliche, schmutzigweiße Bakterienmassen ab, die sich beim Schütteln in großkörnigen Flocken erheben. Eine Kahmhaut wird nicht gebildet.

2-proz. Traubenzuckerbouillon im Gärungskolben wird nach 2 Tagen bei 37 ° C im offenen Schenkel des Gärungskolbens bald sehr schwach getrübt, bald ganz klar, im geschlossenen klar unter Bildung eines reichlichen, grauweißen Bodensatzes; kein Häutchen, kein Gas.

Flüssige Blutserumkultur: Blutserum bleibt fast klar mit grauweißlichem Bodensatze.

Auf Kartoffeln und in Milch entwickeln sie sich weder bei 37 noch bei 24 ° C.

In alter Blutserumstrichkultur und Traubenzuckerbouillonkultur ist die Entwickelung von Schwefelwasserstoff in Spuren nachweisbar.

Widerstandsfähigkeit gegen Hitze: Setzt man 1—8 Tage lang bei 37 ° C kultivierte, üppig entwickelte Agarstrichkultur in den Brütschrank bei einer Temperatur von 65 ° C, so ist die Lebensfähigkeit der Sarcina bis nach 25 Minuten immer regelmäßig nachweisbar, dagegen geht die Sarcina nach einer oder mehr als einer Stunde regelmäßig zu Grunde. Zwischen der Zeit von 25 und 60 Minuten ist ihre Lebenskraft sehr verschieden, bald ist sie nach 30 Minuten tot, bald lebt

sie noch nach 55 Minuten, durchschnittlich geht sie nach 40 Minuten zu Grunde.

Kocht man bei 37° C 1—30 Tage lang kultivierte Agarstrichkultur oder Bouillonkultur auf dem Wasserbade allmählich und läßt sie unter gewisser Temperatur eine bestimmte Zeit lang liegen, so geht die Sarcina bei 80° C nach 10 Minuten, bei 90° C nach 5 Minuten, bei 95 bis 100° C nach 2 Minuten zu Grunde.

Wie eben erwähnt, gehen Sarcina-Kulturen bei höherer Temperatur schnell zu Grunde, während sie bei 24° C nach 3 Monaten noch weiter fortzüchtbar sind.

Widerstandsfähigkeit gegen Austrocknung: Aus 1—13 Tage alter Agarstrichkultur strich ich auf sterilisierte Deckgläschen möglichst dünn die Bakterienmasse und legte die Deckgläschen in eine sterilisierte Schale und in Brütschränke von einer Temperatur von 24, 37 und 65° C. Nach bestimmter Zeit (anfangs minutenweise, später tageweise) trug ich dieselbe auf Agarplatten über. Dieselben blieben bei 24° C nach 33 Tagen noch üppig fortzüchtbar.

Sie bleibt bei 37° C nach 27 oder 30 Tagen steril, doch sind nach 30 Tagen manchmal einzelne Zellen noch lebend.

Bei 65° C ist nach 6 Tagen ihre Lebensfähigkeit schon nicht mehr nachweisbar, während nach 5 Tagen noch einige Kolonieen sich entwickeln. Legt man die Deckgläschen auf eine Etage, welche in der Schale mit sterilisiertem Wasser steht, so geht die Sarcina nach 30, manchmal nach 60 Minuten zu Grunde, wie Agarkultur im Brütschranke bei einer Temperatur von 65° C.

Widerstandsfähigkeit gegen Karbolsäure: 0,5—5-proz. Karbollösungen setzte ich Sarcina-Masse aus dem Belage der Agarstrichkultur zu und übertrug sie nach bestimmter Zeit auf frische Agarnährböden. Ich fand dabei, daß die Sarcina in 0,5-proz. Karbollösung nach 45 Stunden, in 2-proz. Lösung nach 7 Stunden noch Lebenskraft hat, daß sie in 2-proz. Lösung nach 10 Stunden, in 3-proz. Lösung bald nach $1^1/_2$, bald nach 5 Stunden, in 5-proz. Lösung schon nach 20 Minuten zu Grunde geht.

Widerstandsfähigkeit gegen	Temperatur oder Proz.	Lebensdauer	Tot nach
Hitze	24° C	über 3 Monate	
„	65° C	25—55 Minuten	30—60 Minuten
„	80° C	5 „	10 „
„	90° C	2 „	5 „
„	95—100° C		2 „
Austrocknen	24° C	über 33 Tage	
„	37° C	26—30 „	27—33 Tage
„	65° C	5 „	6 „
Karbolsäure	0,5 Proz.	über 45 Stunden	
„	2,0 „	7 „	10 Stunden
„	3,0 „	1—4 „	$1^1/_2$—5 Stunden
„	5,0 „	10 Minuten	20 Minuten
Lysol	0,33 Proz.	3 Tage	4 Tage
„	1,0 „	1 Stunde	$1^1/_2$ Stunden
Sublimat	0,02 Proz.	über 6 Tage	
„	0,0333 „	„ 6 „	
„	0,1 „	20 Minuten	30 Minuten
„	0,2 „	10 „	20 „

Im allgemeinen hält man bekanntlich im Sputum nachweisbare säurefeste Bacillen für Koch'sche Tuberkelbacillen; säurefeste Bacillen sind jedoch nicht immer Tuberkelbacillen, wie A. Fraenkel[1]) u. A. nachgewiesen haben, sondern es finden sich auch Pseudotuberkelbacillen unter besonderen Umständen, z. B. bei einem Falle von Lungengangrän, auch in den Luftwegen, in Fällen, wo die Sektion nichts von Tuberkulose auffinden läßt. In ähnlicher Weise dürfen wir, wie sich aus den obigen Untersuchungen ergiebt, bei der Untersuchung gonorrhoischen Eiters nach Gram entfärbbare semmelförmige Diplokokken nicht immer für Gonokokken halten, denn, wenn auch die Gonokokken im allgemeinen nur intracellulär vorkommen, während die von mir beschriebene Sarcina nicht im Protoplasma der Leukocyten auftritt, so treten die Gonokokken doch auch in einzelnen Fällen extracellulär auf, ebenso wie andererseits die Sarcina Leukocyten aufgelagert sein und so eine intracelluläre Lagerung vortäuschen kann. Man muß daher, um bei der Diagnose sicher zu gehen, in mehreren Präparaten nach Anhäufungen der Diplokokken die Umgebung der Kerne durchsuchen und dürfte bisweilen sogar die Kultivierung der Kokken nötig erscheinen.

Ob diese Sarcina pathogene Wirkungen für Menschen enthalten kann, muß nach dieser einzigen Beobachtung dahingestellt bleiben; erwähnt sei nur, daß sie für Mäuse und Kaninchen pathogen ist.

Zum Schlusse spreche ich Herrn Prof. Israel für die Ueberlassung des Materials und die gütige Unterstützung meinen herzlichsten Dank aus.

Figurenerklärung.

Fig. 1. Strichpräparat aus Sarcinakultur in mit Bouillon verdünntem Eiter. (3 Teile Eiter : 10 Teile Bonillon.) 2 Tage bei 37° C. Vergr. 1 : 700 (vgl. Versuch 10). Blaugefärbte Kugeln sind Eiterkokken; braungefärbte sind Sarcinen, welche die Degenerationsformen zeigen.

Fig. 2. Strichpräparat von der Milz der Maus, welche 3 Tage nach der Infektion gestorben ist (vgl. Maus 1). Vergr. 1 : 555.

Ueber eigenartige Parasitenfunde bei Syphilis.

Ihre Bedeutung für die Entstehung, Diagnose und Ausbreitung dieser Infektionskrankheit bei Erwachsenen und Kindern, sowie für die Beziehungen der Syphilis zu anderen Krankheitsprozessen.

Von Prof. Dr. **Max Schüller**, Berlin.

Mit 6 Tafeln.

Vorbemerkung. Im Frühjahre 1901 habe ich in meinem Buche, betitelt „Die Parasiten im Krebs und Sarkom des Menschen“ (mit 3 Tafeln und 64 Abbildungen im Texte, erschienen bei Gustav Fischer in Jena) meine mehrjährigen Untersuchungen über die von mir entdeckten Parasiten und ihre ätiologische Beziehung zum Krebs und Sarkom des Menschen mitgeteilt.

Da ich in den folgenden Blättern wiederholt Veranlassung haben werde, auf die in jenem Buche geschilderten Parasiten zu verweisen, sehe ich mich angesichts der

1) Ref. Münch. med. Wochenschr. Jahrg. XLIX. No. 6. p. 255.

Fig. 1.



Fig. 2.



Verlag von Gustav Fischer, Jena.

P. Weise, Lith., Jena.

Angriffe, die dieselben, aber durchaus unberechtigt, erfahren haben, zu folgender kurzen Feststellung veranlaßt:

Nach meinen vielfachen wiederholten Untersuchungen an Kulturen und an Schnitten habe ich bei Krebs und Sarkom des Menschen Parasiten von eigentümlicher Form beschrieben, deren wichtigste Entwickelungsstadien ich als große Kapseln und junge Organismen bezeichnete, welche letzteren ich als die eigentlichen Krankheitserreger ansehe. In einer Arbeit aus der Heidelberger chirurgischen Klinik wurde von Dr. Völcker, der unfähig war, diese Dinge in Schnitten zu finden und Kulturen zu gewinnen, behauptet, daß ich mich habe täuschen lassen durch Korkzellen, die durch irgendwelche Verunreinigung in meine Präparate hineingekommen seien. Diese Ansicht wurde gegründet auf eine Reihe teils willkürlicher Angaben, teils durchaus irriger Voraussetzungen.

Ich habe schon in dieser Zeitschrift (Bd. XXX. 1901. No. 8) wie in der Deutschen medizinischen Wochenschrift (1901. No. 36) ausführlich dargethan, daß diese Behauptungen weder für meine Kulturen noch für meine Schnitte zutreffen, und daß überdies schon in meinem Buche eine ganze Reihe anderer Methoden angegeben war, bei welchen dieselben Dinge festgestellt waren, ohne daß dabei auch nur irgendwelche Möglichkeit einer derartigen Verunreinigung hätte vorliegen können. Auch Prof. Hauser hatte nach einigen wenigen ihm zu Gesicht gekommenen Präparaten von mir im Sommer 1901 die großen Kapseln irrtümlich als „Stein- oder Korkzellen" bezeichnet, überdies meine in meinem Buche ausführlich begründete Auffassung derselben gänzlich mißverstanden, was ich beides gleichfalls schon an anderer Stelle widerlegt resp. richtig gestellt habe. Ich habe gleichwohl von jener Zeit ab grundsätzlich in jedem Falle alles vermieden, was auch nur zu einer selbst unbeabsichtigten Verunreinigung oder Berührung mit Kork hätte veranlassen können, und habe, wie mir das nicht wunderbar erscheinen konnte, genau die gleichen Dinge feststellen können. Aber es hat sich auch ergeben, daß alle anderen mir von diesen und von verschiedenen anderen Seiten teils infolge oberflächlicher Lektüre, teils aus Mißverständnis und Irrtum gemachten Einwendungen durchaus unzutreffend sind. Leider kann ich auch sachliche Einwendungen hier im einzelnen nicht weiter verfolgen, verweise jedoch auf meine darüber erschienenen Publikationen in dem „Centralblatt für Chirurgie". 1902. No. 8, sowie in dem „New York Medical Journal". 1902. 18. Jan., in „La Médecine moderne" (Paris). 1902. No. 7, sowie auf meine früheren Mitteilungen im „Weekblad van het Nederl. Tijdschr. voor Geneeskunde". 1901 vom 21. Sept. u. 5. Okt. Ich darf noch anführen, daß man nach einem in der chirurgischen Sektion des 52. Kongresses der American Medical Association gehaltenen Vortrage von Prof. Roswell Park im Buffallo-Cancer-Laboratory (Amerika) zu einem in allen wesentlichen Punkten mit meinen Untersuchungen übereinstimmenden Ergebnis kam (siehe „The Journ. of the American Med. Association" 1901. 14. Sept.; siehe auch das Referat hierüber in dem „Centralbl. f. Chir." 1901. No. 41). Ferner gelang es nach der „Indian Medical Gazette" und nach einem vom 12. Februar 1902 aus Calcutta datierten ausführlichen Telegramme der „Daily Mail" (vom 13. Febr.) Dr. Rost am bakteriologischen Institute zu Rangoon (Indien), aus Krebs und Sarkom verschiedener Organe einen bestimmten Parasiten zu kultivieren, von welchem er nach dem Telegramme wörtlich sagte, „daß er dem ähnlich erscheint, der von Prof. Schüller in seinem Werke ‚Die Parasiten im Krebs und Sarkom des Menschen' beschrieben ist". Meine Präparate von Kulturen und Schnitten habe ich wiederholt, so erst kürzlich auf dem Deutschen Chirurgenkongreß 1902 demonstriert (siehe die Verhandlungen desselben). Kulturen gelangen mir auch neuerdings.

Nach meinen eigenen seit dem Erscheinen des Buches fortgeführten Untersuchungen ist es für mich kein Zweifel, daß die Angaben, die ich in meinem Buche gemacht habe, in allen wesentlichen Punkten zutreffend sind, daß nach meiner Ueberzeugung in den von mir entdeckten und beschriebenen Parasiten ich den wirklichen Erreger des Krebses beim Menschen gefunden habe. Ich betone das deshalb, weil ich bei den folgenden Untersuchungen über die Syphilis an vielen Stellen an diese Publikation anzuknüpfen haben werde.

Schon in meiner ersten kurzen Mitteilung: „Beitrag zur Kenntnis der Syphilisätiologie" (diese Zeitschr. Abt. I. Bd. XXVII. 1900. 20. April. p. 516) habe ich angegeben, daß ich nicht nur in den initialen Erscheinungen der Syphilis, sondern auch bei sekundären und tertiären, sowie bei hereditär syphilitischen lokalen Erkrankungen bestimmte eigentümliche Organismen gefunden und zum Teil auch kultiviert habe, welche, so sehr

sie auch in ihrer äußeren Form und, wie sich später bei Tierversuchen zeigte, noch mehr in der Einwirkung auf die Gewebe von den von mir im Krebse entdeckten Parasiten abweichen, doch in ihrer Entwickelungsweise, in den Entwickelungsstadien und Lebensbedingungen manche Uebereinstimmung mit jenen zeigen. Ich habe deshalb schon in meinem oben erwähnten Buche die Vermutung ausgesprochen, daß die Parasiten beider Krankheiten zu einer großen Gruppe niederer, wahrscheinlich tierischer Organismen gehören. Dieselben dürften als bewegungsbegabte kernhaltige Gebilde von einfachem Bau zu den Protozoen zu rechnen sein. Doch sind sie den Protozoenforschern bisher gänzlich unbekannt geblieben [1]). Aber eben der Umstand, daß wir es hier mit den Zoologen noch unbekannten und von ihnen noch nicht studierten niederen tierischen Lebewesen zu thun haben, hat mich abgehalten, die für die Entwickelungsphasen bekannter Protozoengruppen von den Zoologen eingeführte Terminologie ohne weiteres auf meine Parasiten zu übertragen, so sehr auch manche Beobachtung hierzu verlocken konnte. Ich hielt es, um nichts zu präjudizieren, für richtiger, die verschiedenen Entwickelungsformen meiner Parasiten in einfach verständlicher Weise zu bezeichnen, so wie es in meinem Buche geschehen ist. Da nun die von mir bei Syphilis gefundenen Parasiten eine ähnliche Entwickelungsweise und ähnliche Entwickelungsformen erkennen lassen, wenn sie auch in manchen Einzelheiten abweichen, so habe ich die gleichen Bezeichnungen beibehalten, welche ich den Entwickelungsformen der Parasiten im Krebs und Sarkom des Menschen gegeben habe. Die genauere zoologische Bestimmung überlasse ich der zoologischen Forschung.

Nur wenige Krankheiten sind an einem leider nie versiegenden Materiale in allen verschiedenen Erscheinungsformen so eingehend studiert worden, wie die Syphilis. Von jeher hat sich die Syphilis als Spezialfach der Vorliebe zahlreicher Aerzte zu erfreuen gehabt. In diagnostischer, klinischer und besonders therapeutischer Beziehung ist außerordentlich viel geleistet worden. In der pathologischen Anatomie der Syphilisprozesse hat man außer den bekannten histologischen Arbeiten Unna's sich, wenigstens nach den Lehrbüchern zu urteilen, vielfach mit früheren Darstellungen genügen lassen. Die ätiologische Forschung hat sich hier vorzugsweise in der modernen Richtung bewegt, indem seit Lustgarten's grundlegenden Arbeiten [2]) nur Parasiten aus dem Gebiete der Bakterien gesucht wurden. Aus der neuesten Zeit erwähne ich die Kulturen von van Niessen [3]), von Louis Jullien und J. D. Lisle [4]), von Joseph und Piorkowski [5]).

Man möge es mir nicht übel deuten, wenn ich diese an sich gewiß

---

1) Ich benutze die Gelegenheit, einen Lapsus calami meines Buches „Die Parasiten im Krebs und Sarkom des Menschen“ zu korrigieren. Dort steht in dem Abschnitte G. „Die biologische Zugehörigkeit der von mir entdeckten Parasiten“ p. 107, daß ich meine Vermutung, daß sie zu den Protozoen gehören möchten, nicht mehr aufrecht erhalten könnte, während ich doch betone, daß es „wahrscheinlich niedere tierische Organismen seien“. Es muß natürlich an der betreffenden Stelle heißen, „daß sie zu den bisher bekannten Protozoen gehören möchten“.

2) Wien. med. Wochenschr. 1884. No. 47. — Jahrbücher d. Gesellsch. Wiener Aerzte. 1885. p. 89. — Die Syphilisbacillen. Wien 1885.

3) Wien. med. Wochenschr. 1899. No. 11.

4) Académie franç. 1901. 2 juillet.

5) Berl. med. Ges. 1902. 5. März.

sehr verdienstvollen Arbeiten derjenigen Untersucher, welche diese oder jene Bacillen fanden und sich für ihre ursächliche Bedeutung erklärten, aus Mangel an Zeit und Raum hier nicht bespreche. Ich darf nur noch anführen, daß ich selber vor Jahren zahlreiche Untersuchungen nach dieser Richtung an frischem Materiale angestellt habe, welches mir der verstorbene Geh. Medizinalrat Lewin mit bekannter Liebenswürdigkeit in reichem Maße aus der von ihm geleiteten Abteilung über Syphilis (Charité, Berlin) zugehen ließ.

Ich konnte damals auch histologisch Bacillen nachweisen, doch gewann ich wegen der verschiedenen Formen nicht den Eindruck, daß sie von wesentlicher ätiologischer Bedeutung sein könnten. Tierversuche haben bekanntlich auch keine ganz zweifelsfreien Erfolge gehabt. Solche habe ich auch damals mehrfach wiederholt in der verschiedensten Weise bei Kaninchen gemacht. Nur einmal hatte die Ueberimpfung eines Stückes einer frischen Induration in das Kniegelenk eines Kaninchens eine Gelenkentzündung mit Zottenbildung der Synovialis und mit einem Knorpeldefekte am Condyl. internus femoris zur Folge, was an die bekannten, zuerst von Virchow beschriebenen Knorpeldefekte und an die anatomischen Befunde bei meinen eigenen Untersuchungen über syphilitische Gelenkerkrankungen des Menschen erinnerte (Max Schüller, Die Pathologie und Therapie der Gelenkentzündungen. Wien und Leipzig 1887). Doch bin ich nach meiner heutigen Auffassung zweifelhaft, ob man dies als eine thatsächliche, wenn auch nur lokale luetische Ueberimpfung bezeichnen darf. Eine allgemeine Anerkennung hat bislang noch keiner der verschiedenen Bacillen gefunden.

Nicht unterlassen möchte ich, darauf hinzuweisen, daß, wie mir erst in diesen Tagen (April 1902) nach vollendeter Niederschrift dieser meiner Arbeit bekannt wurde, vor 10 Jahren Döhle („Zur Aetiologie von Masern, Pocken, Scharlach, Syphilis", diese Zeitschr. Bd. XII. p. 910) bei der Untersuchung einiger primär syphilitischer Geschwüre vom Lebenden eigentümlich geformte bewegliche Körper fand, von welchen er auch einige Abbildungen giebt. Er ist geneigt, denselben eine ätiologische Bedeutung beizulegen. Ob das auch von Anderen geschehen ist und ob seine Befunde von Anderen bestätigt wurden, ist mir nicht bekannt. Kuznitzky beschrieb intracelluläre strukturlose Körperchen, aber anscheinend ganz anderer Art, in gefärbten Deckglaspräparaten (Arch. f. Dermat. u. Syphil. Bd. XLVIII. Heft 1).

Meine neuerliche Inangriffnahme der Frage nach den Entstehungsursachen der Syphilis ging von demselben Gesichtspunkte aus und bewegte sich vielfach auch mit denselben Methoden, welche ich bei der Entdeckung und Untersuchung der Parasiten im Krebs oder Sarkom des Menschen angegeben habe. Leider habe ich aber seit der Veröffentlichung meiner ersten Mitteilung in dieser Zeitschrift (s. o.) bei weitem weniger frisches Material erhalten können als für die Geschwulstuntersuchungen. Meine vielfachen Bemühungen, bei Kollegen mit entsprechendem Materiale Unterstützung zu finden, fielen häufig auf steinigen Boden. Nur für die unten geschilderten Deckglaspräparate vom Lebenden erhielt ich reichliches Material. Für die sonstigen Untersuchungen war ich wesentlich auf das wenige, was mir einige wohlwollende Kollegen zukommen ließen, und auf die seltenen Fälle aus meiner eigenen Praxis, besonders in der Poliklinik, angewiesen. Deshalb zeigen diese Untersuchungen zu meinem Bedauern noch an vielen

Punkten Lücken. Da ich aber vorläufig keine Möglichkeit sehe, das Fehlende bald zu vervollständigen und doch annehme, daß das, was ich mitteile, nicht bloß für die Syphilidologen, sondern für die Aerzte in weitem Kreise von großem Interesse und auch für viele hygienische Fragen von Bedeutung und wichtig sein wird, so schließe ich vorläufig ab.

Parasiten in syphilitischen Initialerscheinungen.

Ich habe schon früher mitgeteilt, daß ich in der Mitte der frischen Initialsklerose ganz eigentümlich gewundene oder zickzackähnliche Gänge gefunden habe, welche von der Oberfläche aus in die Tiefe hineinführen und höchst eigentümliche Gebilde bergen, wie ich weiter unten ausführlich beschreiben werde. Da diese Gänge augenscheinlich die Invasionswege resp. Eingangspforten der syphilitischen Infektion darstellen, so schien es mir vor allen Dingen besonders interessant, festzustellen, ob auch von der *nicht* excidierten Sklerose bei einfachen Druck- oder Strichpräparaten auf Deckgläsern, die von der Oberfläche genommen wurden, dieselben Körper oder Teile von ihnen, welche den Inhalt der Gänge bilden, nachgewiesen werden können.

Deckglaspräparate von der Oberfläche der syphilitischen Initialsklerosen und Strichpräparate von Schnitten.

Die Deckglaspräparate habe ich in der Weise gewonnen, daß ich das gereinigte Deckglas direkt auf die feuchte Mitte des Primäraffektes aufdrückte. Oder es wurde vorher die Stelle, an der die Initialsklerose selber sitzt, entweder mit in Sublimatlösung oder mit in sterilem Wasser angefeuchteter Watte abgetupft, dann abgetrocknet. Dann wurde das vorher sorgfältigst gereinigte Deckglas direkt auf die mittlere Partie der Sklerose *aufgedrückt* oder darüber weggestrichen. Zweckmäßig ist es, daß man stets *zugleich einen leichten Druck von den Seiten her gegen die Basis der Sklerose ausübt.* Das Druck- oder Strichpräparat auf dem Deckglase kann entweder direkt, mit etwas sterilem Wasser oder dergleichen befeuchtet angesehen werden. Oder — das war oft nicht zu umgehen und mußte aus leicht verständlichen Gründen am häufigsten geschehen — nach dem Trocknen der Deckglaspräparate an der Luft (*nicht* in der Flamme) läßt man einen Tropfen aufhellenden Oeles (Xylol) auf das Präparat auffallen und kann nun direkt in dem Oele untersuchen; oder man schließt nach dem Trocknen des Xylols sofort in Xylolbalsam ein und betrachtet es bei guter Beleuchtung. Erhitzen des Präparates und jede Verschiebung des Deckglases muß vermieden werden, da sonst die zarten Gebilde in ihrer Form verändert oder zerstört werden. Die Präparate zu färben, ist nicht zweckmäßig. Ich habe nun in allen diesen Fällen, natürlich neben einzelnen Epithelzellen und einzelnen roten und weißen Blutkörperchen eventuell auch Eiterkörperchen, auf die ich hier nicht weiter eingehen will, zunächst *kleine Reste oder leere Hüllen von denjenigen Gebilden* gesehen, welche ich auch hier *große Kapseln* nenne. Aber ich muß gleich bemerken, daß sie vor allen Dingen nach der Größe wie auch in der Farbe etwas, mehr noch in der Form abweichen von denen, die ich beim Carcinom entdeckt habe. Wenn man diese Gebilde gut erhalten antrifft, so erscheinen sie gewöhnlich in einer etwa birnenähnlichen Form oder wie ein Dreieck, dessen kurze Ecken etwas abgerundet sind, während die dritte Ecke

mehr scharf zuläuft. Sie haben eine bräunlich-gelbliche, bei guter Beleuchtung glänzende Farbe, und zwar ist der Inhalt dunkler, dunkelbraun, oft bis schwarzbraun, während die ihn umgebende Hülle hellgrünlichgelb glänzend erscheint. Bei entsprechender Vergrößerung sieht man deutlich an der Oberfläche einzelne kleine knopfartige Erhöhungen. Außerdem findet man häufig dunkelbraune, ähnlich geformte Massen, zuweilen mit kleinen Höckerchen besetzt, welche aus den Hüllen herausgefallene Protoplasmamassen der Kapsel zu sein scheinen, an denen mitunter auch ein rundlicher oder eckiger Kern zu sehen ist. Endlich aber findet man in manchen Präparaten wesentlich kleinere dunkle, einzelne oder zu mehreren zusammenhängende rundliche oder ovale Körper, die deutlich eine nach dem doppeltkonturierten Randsaume zu gerichtete radiäre Strichelung zeigen. Sie sind hellgrünlichgelb, leicht glänzend oder dunkler und matter in der Farbe. Ich bezeichne sie hier auch als junge Organismen, da sie durchaus den jungen Organismen gleichen, welche bei den später zu beschreibenden Kulturen sich zum Teil innerhalb solcher Kapseln, ähnlich den vorher beschriebenen, entwickeln, zum Teil anscheinend aus einer Teilung hervorgegangen sind. Die leeren, mehrfach zerrissenen oder zusammengefalteten Hüllen der großen Kapseln haben entweder die oben beschriebene Farbe oder sie sind heller, zuweilen ganz blaß, farblos, zuweilen aber auch fahlgrau gefärbt. Ich bemerke im voraus, daß diese eben geschilderten Gebilde zum Teil wohl der Oberfläche anhaften, zum großen Teil aber augenscheinlich aus den später zu beschreibenden Gängen herausgedrückt worden sind. Das wird sich noch genauer aus der Schilderung des Inhaltes derselben ergeben. Zuweilen findet man sogar kleine zusammenhängende Gruppen von kleinsten bläschenförmigen Körpern mit doppeltkonturierter Wand, welche ganz denen entsprechen, die ich zuweilen an Schnittpräparaten innerhalb der Gänge gefunden habe (s. u.). Ich gebe auf der Tafel I Abbildungen, welche man gewissermaßen als Typen der einzelnen bei solchen Strichpräparaten gefundenen Gebilde auffassen kann, und zwar ist Fig. 1 bei ganz schwacher Vergrößerung von 150 (Messter) resp. 90 (Zeiss) gezeichnet, Fig. 2 bei stärkerer Vergrößerung von 450 (Zeiss). Bei der Fig. 2 *p*, welche die dunkelbraune Inhaltsmasse dieser dreieckigen oder spitzrunden Kapseln darstellt, ist der Kern sehr deutlich zu sehen. Die leeren Hüllen, die hier abgebildet sind, sind meist ganz blaß oder von gelbbräunlicher Farbe. In Fig. 3 *a* sieht man eine kleine Gruppe von jungen Organismen bei einer Vergrößerung von 450 (Zeiss). In einzelnen derselben ist sogar ein Kern deutlich zu sehen, in einem ein geteilter Kern (Sporen?). Daneben habe ich abgebildet Doppelformen und eine Gruppe von spitzrunden, im Längsdurchmesser aufeinander geschichteten Bläschen, welche nahezu grünlichbraun mit deutlicher doppelter Kontur, aber anscheinend gleichmäßigen Inhaltes oder leer erscheinen. Sie entsprechen einer Gruppe augenscheinlich abgestorbener junger Organismen. Bei älteren ulcerierten Sklerosen sind die Befunde von Deckglaspräparaten häufig nicht so klar, weil die Gebilde gewöhnlich mehr oder weniger zerfallen erscheinen. Immerhin kann man auch darin noch die Parasiten nachweisen und auch noch gut erhaltene treffen. Die Tafel I, Fig. 5 giebt einzelne Typen wieder. Die besten Bilder geben möglichst frische Sklerosen. Hier habe ich das eine oder andere der beschriebenen Gebilde niemals, auch nicht bei für mich von Anderen angefertigten Deckglaspräparaten von echten Initialsklerosen ver-

mißt. Die Formen sind — natürlich bei entsprechend vorsichtiger Herstellung der Präparate — dann meist noch so gut erhalten, daß ohne Schwierigkeit danach, wie ich wenigstens glaube, die Diagnose auf Syphilis gestellt werden kann. Für besonders beweiskräftig in diesem Sinne halte ich vorzüglich die Anwesenheit der von mir als junge Organismen bezeichneten Gebilde.

Seltener findet man bei den Deckglaspräparaten von der Oberfläche auch noch ein anderes Element, welches ich als eine häufige Begleiterscheinung der Parasiten im Krebs und Sarkom beschrieben habe, nämlich das von mir sogenannte Maschenwerk, hier allerdings nur in kleinen Partikeln. Ganz regelmäßig ist dasselbe aber von mir vorgefunden worden bei Strichpräparaten, welche ich von der Querschnittfläche frisch ausgeschnittener Initialsklerosen gemacht hahe (siehe Tafel I, Fig. 4). Man findet in der Regel nur kleinere Bruchstücke, sehr selten zusammenhängende Netze, aber sie sind im einzelnen ganz deutlich von gleicher zarter Struktur und Farbe, ähnlich, wie ich es früher von den in den Carcinomen beschrieben habe. Man sieht bei der Sklerose sehr häufig diese feinen Scheidewände in fahler rauchgrauer Farbe, und das erscheint besonders der Fall zu sein bei Sklerosen, welche vorher lokal mit Kalomel oder dergleichen behandelt waren, ebenso aber auch bei denjenigen Fällen, welche eigentlich mehr oder weniger längere Zeit bestehende Geschwüre darstellen. (Bei Carcinomen habe ich ähnliche fahlgrau gefärbte Reste von Maschenwerk besonders bei den oberflächlich ulcerierten Partieen von Portio- und Peniskrebs, sowie von Krebs an anderen Körperstellen gefunden.) In einzelnen derartigen Strichpräparaten von Sklerosenschnitten sind sie auffällig zahlreich, doch, wie gesagt, immer nur in ganz kleinen Fetzchen vertreten. Aber die Erscheinung ist so charakteristisch, daß sie nicht leicht übersehen werden kann, wenn man direkt darauf aufmerksam macht. Daneben findet man nun stets auch noch bei diesen Strichpräparaten von Querschnitten einzelne der vorher geschilderten Gebilde, aber, wie mir scheint, selten in solcher Reichlichkeit und noch so relativ gut erhalten, wie bei den von der Oberfläche in vorgeschriebener Weise genommenen Präparaten, oft nur Bröckel und Bruchstücke davon. Reichlicher fand ich besonders Kapseln und junge Organismen in dem mit Blutgerinnseln vermengten Alkohol, in welchem Stücke einer frisch exstirpierten durchschnittenen Sklerose sofort nach der Operation aufgehoben wurden (in einem Glase mit Glasstöpsel). Die großen Kapseln und die typischen größeren jungen Organismen treten in diesen Sedimentpräparaten sofort hervor, wenn letztere nach dem Eintrocknen auf dem Objektträger mit einem Tropfen Essigsäure behandelt werden. In Tafel I, Fig. 4 habe ich nach verschiedenen ungefärbten Strichpräparaten von frisch ausgeschnittenen Initialsklerosen einzelne Typen der Maschenwerkreste abgebildet; in *aa'* ältere rauchgraue, mit anscheinend derberen, jedenfalls sofort als solche auffallenden Zwischenwänden, in *a''* noch hellgelbliche, mit äußerst feinen, fast farblosen, aber doch erkennbaren Zwischenwänden. Es ist also auch hier nicht etwa ein fädiges Netzwerk, sondern ein thatsächliches Fachwerk. Außerdem habe ich mehrere gut erhaltene große Kapseln abgezeichnet. Dieselben haben ein gelblich-braunes, bald mehr glänzendes, bald matt erscheinendes Protoplasma, in welchem zuweilen ein Kerngebilde deutlich hervortritt. Die Kapselhülle ist blaß, bei einzelnen geplatzt oder gefaltet. Auch aus den Kapseln frei gewordene, meist gelb- bis dunkelbraune

Protoplasmamassen, sowie einige junge Organismen habe ich abgebildet. Letztere sind etwas lädiert, der doppeltkonturierte Randsaum und an einzelnen Stellen die radiäre Streifung, die dunklere körnige Inhaltsmasse sind aber gleichwohl noch zu erkennen. Zuweilen erscheinen sie noch mehr deformiert, länglich verzogen. Das dürfte wohl Schuld der Herstellungsweise der Präparate sein. Man thut am besten, auch diese nicht als Strich-, sondern als einfache Aufdruckpräparate herzustellen und Verschiebungen des Deckglases zu vermeiden. — Interessant dürfte sein, daß in zahlreichen gefärbten Strichpräparaten von Sklerosequerschnitten, welche ich, wie früher bemerkt, vor vielen Jahren zur Aufsuchung von Bacillen angefertigt hatte, durchgehends überall Partikel von diesem Maschenwerk und hie und da auch Reste von Kapseln u. s. w. zu bemerken sind. Auch in einem Strichpräparate von dem Querschnitte einer frisch excidierten Initialsklerose der Oberlippe fanden sich dieselben Dinge.

Diese Beobachtungen, zumal an den Deckglaspräparaten von der Oberfläche der Sklerose, welche ich in den letzten Monaten durch das Entgegenkommen mehrerer Kollegen an zahlreichen Fällen machen konnte und welche ja leicht von Jedem wiederholt und kontrolliert werden können, scheinen mir von außerordentlicher Bedeutung zu sein, indem sie nicht nur die Diagnose selbst in den Fällen von kürzestem Bestande ermöglichen oder doch sichern werden, sondern auch weiter ein helles Schlaglicht auf den Vorgang der Uebertragung werfen. Ich habe sie bisher in keinem Falle von Initialsklerose vermißt; wohl aber fehlten sie in dem einzigen Falle von Ulcus molle, den ich bislang untersuchen konnte.

Schnittpräparate von syphilitischen Initialsklerosen. Gänge mit eigentümlichen Parasiten in den oberen Schichten und die Verteilung der Parasiten in dem tieferen Gewebe.

Um die von mir entdeckten Gänge mit den eigentümlichen Parasiten gut nachzuweisen, eignen sich am besten kleine, nicht ulcerierte Initialsklerosen, frisch nach der Infektion entstandene kleine, möglichst einfache, primäre syphilitische Verhärtungen, oder höchstens oberflächlich erodierte Indurationen. Wenn man hier nach vorheriger Alkoholhärtung und Celloideinbettung, welche auch hier den Vorzug verdient vor der Paraffineinbettung, einen Mikrotomschnitt aus der Mitte senkrecht zur Oberfläche nimmt, und nach irgendwelcher einfachen Färbung (z. B. Hämatoxylin) untersucht, so sieht man, daß sich der Papillarkörper von beiden Seiten her über der mittleren, entzündlich infiltrierten, etwas gewölbten, indurierten Partie abflacht, so daß die Mitte selber gewöhnlich nur von einer mehr oder weniger verdünnten Epidermisschicht oder von einer noch mit einzelnen Epithelzellen vermischten trübkörnigen Lage (einer Art weichen Schorfes) bedeckt ist. Entwässert man nun den folgenden, also gleichfalls aus der Mitte der Induration genommenen Mikrotomschnitt in absolutem Alkohol und hellt ihn durch (event. filtriertes) Lavendelöl, Hopfenöl, Citronenöl, Xylol u. a. auf, so sieht man oft schon bei schwacher Vergrößerung gerade die verdünnte Decke in der Mitte von oft äußerst feinen, meist dunkelbraunen, gewundenen Schläuchen durchsetzt. Nimmt man starke Vergrößerung mit Immersion und Abbe'scher Beleuchtung, so erkennt man deutlich, daß die Schläuche oder Gänge einerseits, bis

zur Oberfläche andererseits in das darunter liegende Bindegewebe führen. Besonders zahlreich erscheinen sie auf schrägen, fast flächenartigen Schnitten (Taf. I, Fig. 6 und Taf. III, Fig. 27 bei schwacher Vergr.). Ihr Verlauf ist in dem aufgehellten Gewebe ziemlich scharf vorgezeichnet durch vereinzelte gefärbte Körnchen oder durch den bräunlichen Inhalt. An anderen Stellen sieht man sie gleichsam durch dunkle Schattierung angedeutet (Fig. 8, 10, 30). Auch da, wo das Epithelzellengefüge der dünnen Decke noch erhalten ist, ist es längs des Verlaufes dieser Gänge und Schläuche deutlich wahrnehmbar unterbrochen. Die obersten Schichten sind gewissermaßen aufgewühlt, unterminiert, die weichen Epidermiszellen körnig zerfallen, auch die in der Nähe oft trübe, mit feinkörnigem Protoplasma und undeutlichem Kern, zuweilen aber kaum verändert (s. Fig. 11 a, b, c). Seltener durchsetzen die Gänge die schmale Epidermisdecke oder den Schorf und das indurierte Bindegewebe ganz gerade, gewöhnlich mit scharf begrenztem, gewundenem, spiraligem, zickzack- oder schraubenförmigem Verlaufe, da und dort Verbreiterungen aufweisend. Unterhalb der Oberfläche nehmen sie oft auch zunächst einen mehr schrägen oder horizontalen Verlauf. Ist die Epidermisdecke, wie häufig zu sehen, durch einen dünnen Schorf ersetzt, so fällt die Hauptmasse des Gangwerkes in das entzündlich verhärtete Bindegewebe. Dann stellt aber gleichwohl ein feiner, meist zickzackförmiger Weg, nicht bloß plastisch, sondern oft auch durch bräunliche Farbepartikel angedeutet, den Zusammenhang zwischen den in geringer Entfernung unter der freien Oberfläche liegenden breiteren Schläuchen und dieser selber her. Es führt thatsächlich auch dann ein feiner Gang von der Oberfläche zur Tiefe. Vielfach sieht man zwischen den Zellen des äußersten Randsaumes über oder neben der äußeren Mündung der feinen Gänge kleine dunkelbraune oder braun-gelbliche, glänzende, blasige Körper von rundlicher oder länglich-ovaler Form (s. Taf. I, Fig. 7, 9 u. Taf. III, Fig. 28, 29, 30). Solche füllen mit größeren Gebilden auch die breiteren Gänge oder Schläuche. Gewöhnlich liegen in denselben dicht aneinander gedrängt oder einer hinter den anderen gereiht, aber seinen Nachbar gewöhnlich zur Hälfte deckend, länglich-ovale oder spitzrunde, geschoßähnliche Körper. In mit Jod-Jodkali behandelten Präparaten sahen sie dunkelbis violettbraun aus, in einfach aufgehellten Präparaten dunkelbraun oder dunkel-gelblich, in mit wässerigen Salzlösungen aufgehellten Schnitten wesentlich heller, mehr gelb-grünlich, aber in der Form klarer. Sie erscheinen mit rauher oder feinborstiger Oberfläche. Wie aber ein gelegentlicher Durchschnitt (s. Fig. 8, 12 a u. b) lehrt, bestehen sie aus doppeltkonturierten, oft fein radiär gestreiften Kapseln mit dunklem Protoplasma oder angefüllt mit Körnchen (Sporen) oder mit jungen Organismen von rundlicher oder ovaler Form. In Taf. I, Fig. 13 a, b, c, d habe ich einige dieser, direkt aus den Gängen frei gemachten Gebilde neben leeren Hüllen abgebildet. Ich nenne sie auf Grund gewisser, besonders bei den Kulturen hervorgetretener Analogieen mit den gleichen Entwickelungsphasen der Parasiten, die ich im Carcinom und Sarkom kennen gelernt habe, große Kapseln. Doch will ich gleich hier ausdrücklich betonen, obwohl dieses schon aus dem vorher Angegebenen hervorgehen wird und aus den Abbildungen zu erkennen ist, daß sie in der Größe und Form von jenen wesentlich abweichen. Sie sind meist kleiner und von dunklerer Farbe. Vorwiegend ist die dreieckige oder spitzrunde

Form, welche wir schon in den Deckglaspräparaten von der Oberfläche der Initialsklerosen hervorgehoben haben und welche vielleicht bedingt ist durch die Anpassung an die engen Raumverhältnisse der Gänge. Diese Eigentümlichkeiten in der Form, Größe und Farbe charakterisieren diese großen Kapseln in den Gängen und oberen Schichten der Initialsklerose, auch gegenüber denjenigen, welche in den tieferen Schichten und, wie wir später sehen werden, in den Geweben bei den verschiedenen Manifestationen der späteren Perioden der Syphilis liegen. Am Anfange resp. neben der Mündungsstelle dieser geschilderten Gänge habe ich, wie bemerkt, öfters einzelne Kapseln oder auch dunkel gefärbte kleine Körper vom Charakter der jungen Organismen beobachtet. Man trifft solche auch nicht selten da und dort etwas weiter davon entfernt seitwärts in den alleroberstenLagen der Epidermis resp. des Schorfes. Die Gebilde innerhalb der Gänge in den obersten Schichten der Initialsklerose repräsentieren aber anscheinend nicht sämtlich die Entwickelungsform der Parasiten, welche ich als große Kapseln bezeichnet habe, sondern entsprechen augenscheinlich zum Teil nur stärker entwickelten jungen Organismen. Letztere sind übrigens, wie oft sehr schön zu sehen ist, nicht bloß rund, sondern vielfach birnenförmig und liegen dicht aneinander geschmiegt. Sie sind durchaus ähnlich denen, welche wir als junge Organismen in Deckglaspräparaten von der Oberfläche der Sklerosen nachweisen konnten, so daß es gewiß berechtigt ist, letztere wesentlich vom Inhalte der Gänge herzuleiten, wie ich es oben gethan habe. Die kleinsten Gebilde in den Gängen stellen nichts anderes als solche ovale oder birnenförmige, noch nicht weiter entwickelte borstenbesetzte junge Organismen dar, und zwar häufig als teils mit den Längsseiten aneinander liegende, teils semmelförmige Doppelbildungen. In gleichen Doppelbildungen finden sie sich, wie ich im voraus bemerke, bei den Kulturversuchen aus dem Gewebe reichlich entwickelt vor. Auch die kleinen, doppeltkonturierten, birnenförmigen Bläschen, welche, in abwechselnd übereinander geschichteter Reihe liegend, von mir oben in den Deckglaspräparaten beschrieben wurden, sind die Hüllen solcher jungen Organismen. Ich traf sie aber nicht nur in der Oberfläche und in den Gängen. Wenn ich Schnitte von Initialsklerosen zerfaserte und in der beschriebenen Weise aufhellte, so habe ich nicht selten bräunliche oder grünlich-gelbe Doppelstriche zwischen dem Bindegewebe gefunden, welche bei starker Vergrößerung (Immersion 1000) sich darstellten als kleinste, ovale oder länglich-zusammengelegte doppeltkonturierte Blasen (siehe auch meine erste Mitteilung in dieser Zeitschrift. Bd. XXVII. No. 14/15). Sie sind leere Hülsen oder abgestorbene junge Organismen. Ich habe solche aus dem zerfaserten Bindegewebe einer älteren, in Alkohol gehärteten Induration in Taf. II, Fig. 14a, b, c, d abgebildet. Sie liegen anscheinend in den Saftgängen, teils auch in geschwollenen Lymphgefäßen. In frischeren Präparaten fand ich sie nie so dunkelbraun, sondern viel heller, meist hellgelblich. Ich betone dies ausdrücklich, um vor Enttäuschungen zu schützen.

(Fortsetzung folgt.)

Bemerkungen zu Jäger's „Die in Ostpreussen einheimische Ruhr, eine Amöbendysenterie."

Von Dr. **K. Shiga** aus Japan.

Die Mitteilung Jäger's[1]) veranlaßte mich, auf meine Untersuchungen über Amöben bei der Dysenterie, über die ich in meiner Mitteilung „Ueber den Dysenteriebacillus" (B. dysenteriae) (Centralbl. f. Bakt. etc. Bd. XXIV. 1898. No. 22) schon kurz berichtet habe, nochmals zurückzukommen. Es hat sich nämlich nachträglich herausgestellt, daß die von mir damals gesehenen und beschriebenen Amöben gewöhnliche Coli-Amöben waren und nicht zu der zuerst von Lösch, dann von Koch, Kartulis, Kruse, Pasquale u. A. beschriebenen Art gehörten. In meiner Mitteilung habe ich nur das Faktum konstatiert, daß sie sich bei 34 Fällen von Dysenterie 5mal fanden, ein Urteil über ihre ätiologische Bedeutung aber nicht abgegeben. Als ich aber dann später bei der Untersuchung einer von den Philippinen eingeschleppten Amöbendysenterie in den Dejektionen massenhaft die echte *Amoeba dysenteriae* Lösch nachweisen konnte, wurde es mir klar, daß die früher von mir gesehenen Gebilde etwas anderes, und zwar *Amoeba coli* waren, Amöben, wie sie im Stuhl bei diarrhöischen Zuständen oder nach Verabreichung von Laxantien öfters gefunden werden.

Untersuchungen, die ich kurz darauf 1898 auf Formosa (Taiwan) bei chronischer Amöbendysenterie vorzunehmen Gelegenheit hatte, erlauben es mir, folgende markante Unterscheidungsmerkmale zwischen der *Amoeba dysenteriae* und *Amoeba coli* anzugeben: 1) *Amoeba dysenteriae* ist gewöhnlich etwa 3—5mal größer als die *Amoeba coli.* Bei der Dysenterieamöbe besteht eine schärfere Grenze zwischen Ekto- und Endoplasma als bei der Coli-Amöbe. 2) Die Bewegungen und Formveränderungen der Dysenterieamöbe sind sehr lebhaft. Untersucht man sie in frisch entleerten Stühlen, so beobachtet man ein derart lebhaftes Spiel der lappigen oder stumpfen, stets vollkommen hyalinen Pseudopodien nach allen Richtungen, daß man diesen Bewegungen kaum mit dem Auge folgen kann. Nach einigen Stunden werden die pseudopodialen Bewegungen träger; es dauert aber immerhin einige Stunden, bis sie dieselben ganz einstellen. Bei der *Amoeba coli* sind die Bewegungen und Gestaltsveränderungen von vornherein enorm träge und langsam, so daß es einige Minuten dauert, bis man eine deutliche Formveränderung oder eine Lokomotion bemerkt. 3) Die Zahl der im Stuhle vorhandenen Amöben ist eine verschiedene, je nachdem die *Amoeba dysenteriae* oder die *Amoeba coli* vorliegt: in letzterem Falle ist es eine mühsame Arbeit, die sehr spärlichen Coli-Amöben zu finden, während die Dysenterieamöbe gewöhnlich gerade durch ihre Massenhaftigkeit auffällt.

Diese Unterscheidungsmerkmale sind zwar schon seit geraumer Zeit bekannt; ich lege aber dennoch Wert darauf, sie hier nochmals zu präcisieren, weil ich zu wiederholten Malen konstatieren mußte, daß Untersuchern oft die Coli-Amöbe als Dysenterieamöbe imponierte.

So liegt der Fall auch bei Jäger: nach seiner Beschreibung muß

1) Centralbl. f. Bakt. etc. Abt. I. Orig. Bd. XXXI. 1902. No. 12.

ich die Diagnose auf *Amoeba coli* stellen. Da Jäger prinzipiell nur ganz frische Stühle untersucht, ist es mir bei der ungemein langsamen Bewegung der fraglichen Gebilde, die aus dem Passus: „4 Uhr 15 Min. liegt sie (Amöbe) in der Nähe einiger roten Blutkörperchen, 12 Minuten später hat sie sich von diesen so weit entfernt, daß dieselben zum Verschwinden aus dem Sehfeld gebracht werden mußten, um die Amöben in demselben festzuhalten“ hervorgeht, kein Zweifel mehr, daß Jäger die *Amoeba coli*, jedenfalls nicht die *Amoeba dysenteriae* vor sich hatte. Ferner lassen die Abbildungen, die er von seinen Amöben giebt, nach Größe und Struktur nur die Diagnose auf *Amoeba coli* zu. Ueber die rundlichen Gebilde, die in Schnittpräparaten der Darmwand als Amöben bezeichnet sind, kann ich mich nicht bestimmt äußern; ich halte ihre Deutung als Amöben für unwahrscheinlich.

Wenn Jäger niemals meinen Bacillus dysenteriae in den Dejektionen seiner Dysenteriekranken hat nachweisen können, so beweist das nichts. Auch mir ging es ähnlich, da ich oft bei leichter Dysenterie oder Enterodysenterie kulturell keinen Dysenteriebacillus finden konnte, während das Auftreten von Agglutination in der Rekonvalescenz oder Steigerung derselben während des Krankheitsverlaufes eine Infektion mit den Dysenteriebacillen außer Zweifel stellt. Auf der anderen Seite können die Dysenteriebacillen zeitweise im Stuhle ganz fehlen; es ist daher erforderlich, daß die bakteriologischen Untersuchungen während des ganzen Verlaufes der Krankheit mehrfach wiederholt werden; manchmal werden dann noch Dysenteriebacillen gefunden. Findet man sie aber nicht, so ist, wie aus obigem hervorgeht, der Schluß auf Nichtvorhandensein einer Infektion mit Dysenteriebacillen unstatthaft.

Wie ich schon in meinem früheren Berichte angegeben habe, müssen die Bacillen- und Amöbendysenterie ätiologisch, klinisch und anatomisch streng auseinandergehalten werden. Namentlich in den Tropen spielt die Dysenterieamöbe eine gewisse Rolle.

Kurz zusammengefaßt unterscheide ich also:

1) Bacillendysenterie, verursacht durch den zuerst von mir gefundenen und dann von Kruse, Flexner u. A. beschriebenen Bacillus.

2) Amöbendysenterie, verursacht durch die *Amoeba Lösch.*

Das Vorkommen von Coli-Amöben beweist für die Zugehörigkeit zu der einen oder der anderen Gruppe durchaus nichts.

Ueber eine neue Infektionskrankheit bei Haustieren.

[Aus dem kgl. ung. bakteriologischen Institute in Budapest.]

Von Dr. **Aladár Aujeszky**,
Adjunkt der kgl. ung. tierärztl. Hochschule in Budapest.

Während jener experimentellen Untersuchungen, welche das wegen Sicherung der Diagnose in das kgl. ung. bakteriologische Institut eingesandte Gehirn wutverdächtiger Tiere betrafen, gelang es mir, in einigen Fällen ein Virus zu finden, welches bei Tieren eine in manchen Symptomen der Wut ähnliche Krankheit verursachen kann. Da ich in der Litteratur über dieses Virus bezw. über die durch dasselbe hervorge-

rufene Infektionskrankheit keine Angabe fand, möchte ich meine diesbezüglichen Erfahrungen mitteilen.

Der erste Fall bezieht sich auf einen $2^1/_2$ Jahre alten Ochsen, welcher eines Morgens aufgebläht und sehr erregt wurde, wild um sich schaute, seine Nase fortwährend an der Krippe rieb, viel nießte, später Muskelzuckungen zeigte. Indem sich diese Symptome immer mehr und mehr verschlimmerten, fiel das Tier nachmittags erschöpft zusammen und ging nach kurzer Agonie zu Grunde. Sektionsbefund (nach Bericht des Veterinärarztes Johann Buzi): Hyperämie des Gehirnes und der Gehirnhäute; zwischen den rechten Nasenmuscheln ist ein 6 cm langer, 2 mm breiter Halm eingekeilt, der Stengel von Centaurea Cyanus (Kornblume), an dessen oberen Ende der Blumenkelch sichtbar ist, die Blumenblätter fehlen; im Dickdarme starker Katarrh mit Hämorrhagieen, Milz normal, Leber blutreich, etwas geschwollen. Aus dem inneren Teile des Gehirnes, welches in mit Essig benäßtem Tuche gut verpackt anlangte, wurde sogleich eine Emulsion bereitet, und damit ein Kaninchen nach der Methode Pasteur-Roux und ein anderes nach der Methode Leclainche-Morell geimpft. Nach ca. 44 Stunden sind beide Tiere sehr unruhig, sie machen, als wollten sie mit ihren Füßen den Ort, wo sie geimpft wurden, reiben, dann bekommen sie tonicoklonische Krämpfe; nach 3—4 Stunden fallen sie erschöpft zur Seite und verenden alsbald. Das Blut, die Milz und das Gehirn dieser Tiere wurde bakteriologisch untersucht — aber Mikroorganismen konnte man weder mikroskopisch noch durch Züchtungsversuche nachweisen. Da wurde das Experiment mit einem Stückchen des in Glycerin aufbewahrten Ochsengehirnes an 4 Kaninchen repetiert (Infektion zweier Tiere intraokulär, des dritten subdural und des vierten intramuskulär). Der Erfolg war derselbe wie vorher; die Tiere gingen binnen 48 Stunden unter denselben Symptomen zu Grunde. Die bakteriologische Untersuchung fiel wieder negativ aus. Daß aber alle diese Kaninchen einem spezifischen Virus erlagen, konnte ich dadurch konstatieren, daß andere Tiere, welche mit der Rückenmarksemulsion der intraokulär und intramuskulär infizierten Tiere **subkutan** geimpft wurden, derselben Krankheit erlagen. Am Impforte dieser Tiere zeigte sich an der Haut nach 36—48 Stunden eine Rötung, welche alsbald in eine Entzündung überging; die Tiere wurden sehr unruhig, sie kratzten und rieben den Impfort fortwährend, kratzten sich oft blutig und gingen nach einigen Stunden zu Grunde.

Nun war es klar, daß ich es mit einem bisher unbekannten Virus zu thun hatte, welches des weiteren Studiums wert ist.

Indem ich mich mit diesen weiteren Untersuchungen befaßte, traf ein zweiter Fall ein. Dieser bezieht sich auf einen Hund, welcher eines morgens sehr unruhig wurde, Speichelfluß bekam, seine gerötete untere Lippe fortwährend kratzte und an der Wand rieb, seinen Maulkorb nicht duldete, sondern wütend herunterriß — und endlich gänzlich erschöpft am anderen Tage zu Grunde ging. Die Impfversuche erwiesen, daß dieser Hund an derselben Krankheit litt.

Der dritte Fall, den ich jüngstens Gelegenheit zu beobachten hatte, betrifft eine Katze, welche auf der internen Klinik der tierärztlichen Hochschule verendete und mir von Prof. Dr. Marek zur Untersuchung gütigst überlassen wurde. Auch dieses Tier hatte an der unteren Lippe

einen entzündlichen Affekt (Schwellung, Rötung), welche es fortwährend kratzte und am Käfig rieb.

Daß diese von Tier zu Tier übertragbare Krankheit durch einen lebenden Infektionsstoff verursacht wird, ist sehr wahrscheinlich; leider war aber all mein Bestreben, diesen Mikroorganismus zu züchten oder wenigstens zu erblicken, erfolglos.

Trotzdem diese Untersuchungen negativ ausfielen, konnte ich doch einige Eigenschaften des Infektionsstoffes feststellen.

Obwohl die diesbezüglichen Experimente noch nicht ganz vollendet sind, will ich einiges darüber schon jetzt mitteilen.

Für das Virus scheinen die meisten Säugetiere empfänglich zu sein. Unter den gewöhnlichen Laboratoriumstieren sind für das Virus die empfänglichsten das Kaninchen, der Hund und das Meerschweinchen, weniger empfänglich ist die Maus und refraktär erwies sich die Taube und das Huhn.

Der Ausgangspunkt der natürlichen Ansteckung ist gewiß ein verletzter Punkt der Haut oder der Schleimhaut. Die experimentelle Ansteckung gelingt sozusagen an jedem Punkte des Organismus ohne Schwierigkeit.

Die Dauer der Inkubation ist je nach der Empfänglichkeit der Tiergattung, nach der Virulenz des Infektionsstoffes und nach dem Körperteile, wo derselbe inokuliert wird, verschieden. Infiziert man Kaninchen mit einigen Tropfen der virulenten Gehirnsubstanz subdural oder intraokulär, so erkranken sie gewöhnlich nach 36—48 Stunden. Nach subkutaner, intramuskulärer oder intraperitonealer Ansteckung beträgt die Inkubation gewöhnlich 40—96 Stunden. Eine Inkubation von 5—8 Tagen ist selten und kommt nur nach der Inokulation von einem schon geschwächten oder sehr stark diluierten Virus vor.

Die pathogene Wirkung dieses Infektionsstoffes kann kurz in Folgendem zusammengefaßt werden: Das erste Symptom der ausgebrochenen Krankheit ist die große Unruhe, welche den an der Impfstelle auftretenden entzündlichen Prozeß begleitet. Das Virus, welches an der Impfstelle sich vermehrt hat, verursacht hier am Anfange Hyperämie, alsbald Entzündung, Hämorrhagie und oft auch Nekrose der Gewebe. Der Grad, welchen dieser örtliche Prozeß erreicht, hängt sowohl von der Virulenz des Infektionsstoffes und der Empfänglichkeit des Tieres wie auch von dem Orte der Inokulation ab. Während wir im Gehirne der subdural angesteckten Kaninchen nur eine Hyperämie sehen, kann die auf subkutanem Wege hervorgerufene Infektion nicht nur zur Entzündung der Haut und des subkutanen Bindegewebes, sondern auch zu Nekrose führen. Spritzen wir aber unter die Haut des Kaninchens ein abgeschwächtes oder stark verdünntes Virus, so erkrankt das Tier später und die örtliche Affektion überschreitet die Grenzen der einfachen Entzündung nicht.

Am Beginne des lokalen Prozesses kann man an den Versuchstieren eine Temperatursteigerung konstatieren, welche manchmal nur einige Zehntel Grade, oft 1—$1^1/_2$°, beträgt. Geschah die artificielle Ansteckung durch die Haut, so schreitet die am Impforte auftretende Rötung schnell vor; die anfangs rosarote Haut bekommt in 1—2 Stunden eine dunkelrote Farbe, kann sogar nekrotisieren, und diese Veränderung kann sich so stark ausbreiten, daß sie sogar die Breite einer kleinen Hand erreicht. War die Eingangspforte der Infektion die Schleimhaut, so ist die lokale Affektion etwas diffuser und geringer. Mit der vorschreiten-

den Verschlimmerung der lokalen Veränderungen graduell wächst auch die Unruhe, die Erregtheit des Tieres. Das starke Jucken kann es verursachen, daß die Tiere den erkrankten Körperteil fortwährend kratzen, lecken, oft auch benagen, und können sie ihn mit ihren Füßen oder mit ihrem Munde nicht erreichen, so trachten sie ihn am Käfig oder an einem anderen Gegenstand zu reiben. Keinerlei aggressives Benehmen bemerkte ich an den Versuchstieren und, wie man mir berichtet, zeigten die erwähnten, natürlich angesteckten Tiere auch keine Aggressivität. — Indem die peinliche Unruhe ihr Maximum erreicht, zeigen sich alsbald Symptome der Erschöpfung; das Tier liegt ermüdet, seine Beine zucken krampfhaft (der Krampf der Kaumuskeln ist sehr häufig). In diesem Stadium sinkt gewöhnlich auch die Temperatur (Kollapstemperatur). Zeitweise probiert das Tier, seine Kräfte zusammennehmend, sich zu erheben, um sich kratzen oder reiben zu können, doch sind seine Füße schon zu schwach, es stürzt kraftlos zur Seite, wird immer schwächer und schwächer, seine Atmung wird auch immer langsamer, ruhiger. Dies Stadium dauert gewöhnlich einige Stunden; selten länger als 12 Stunden, und es ist noch seltener, daß der Tod gleich am Anfange des Stadiums der Erschöpfung oder schon im Stadium der Erregtheit (noch bevor die lokale Veränderung sich stärker entwickelt hat) plötzlich eintritt (Herzlähmung).

Wie ersichtlich, ist die Dauer der Krankheit sehr kurz; sie beträgt 3—30, gewöhnlich 6—10 Stunden.

Die pathologischen Veränderungen, welche man am Kadaver außer den schon geschilderten örtlichen Erscheinungen finden kann, sind bedeutungslos. Hyperämie, eventuell kleine, hirsegroße Blutergüsse in den inneren Organen, besonders im Centralnervensystem und in den Gehirnhäuten, oft auch in der Schleimhaut des Magens und der Gedärme; manchmal Aufblähung der Gedärme und Erweiterung der Urinblase; das sind die sämtlichen Veränderungen, welche uns die Obduktion darbietet.

Das Centralnervensystem enthält das infizierende Virus immer; jenes ist auch im Blute (und daher auch in den blutreichen Organen) fast immer nachweisbar. Frei ist die Galle vom Virus, welches auch in den Urin und, wie es scheint, auch in den Speichel nicht übergeht.

Das Centralnervensystem — vor der Austrocknung bewahrt — kann ziemlich lange virulent bleiben. Wie das Virus der Hundswut, so läßt sich auch dieses Virus in Glycerin gut konservieren. Das in Glycerin aufbewahrte Gehirn bleibt 2—2$^{1}/_{2}$ Monate, ausnahmsweise auch 3 Monate lang virulent.

Der Infektionsstoff scheint nicht sehr kontagiös zu sein. Ich hielt kranke und gesunde Tiere in demselben Käfig und die letzteren erkrankten nie. Obwohl ich die Resistenz des Virus gegenüber Desinfektionsmitteln und gegenüber thermischen Einflüssen eingehender noch nicht studierte, bin ich doch der Ansicht, daß es nicht zu den am leichtesten vernichtbaren gehört. So konnte ich z. B. ein junges Kaninchen mit 1 ccm der mit einer $^{1}/_{2}$-proz. Karbolsäure bereiteten und nach dem Zerreiben sogleich subkutan in das Tier gespritzten Gehirnemulsion tödlich infizieren. Gegenüber diesem stehen Fälle einiger, vielleicht höheren Alters wegen oder aus anderen Gründen minder empfänglichen Kaninchen, bei welchen die Einspritzung einer mit $^{1}/_{4}$- und einer mit 0,1-proz. Karbollösung bereiteten Gehirnemulsion keine Er-

krankung hervorrief. Diese gesund gebliebenen Tiere wurden nach 2 Wochen mit virulentem Virus geimpft, wobei sämtliche der Infektion erlagen. Ebenso wurden gegenüber dem Virus auch jene Kaninchen nicht immun, welchen vor 14 Tagen 2 ccm im strömenden Dampfe 5 Minuten lang sterilisierter Gehirnemulsion eingespritzt wurden. Weiterhin konnte ich konstatieren, daß die Einspritzung der Galle der vom Virus getöteten Tiere den so behandelten Kaninchen auch keinen Schutz verleiht.

Wie aus dem Geschilderten ersichtlich ist, kann man zwischen der hier angeführten Krankheit und der Wut einige verwandte Züge finden, welcher Umstand eventuell auch zu fehlerhafter Diagnose führen kann: Unter den klinischen Symptomen die große Erregtheit des Nervensystems, der rasche Ablauf der Krankheit, die Krämpfe im Stadium der Erschöpfung; weiterhin unter den Eigenschaften des infizierenden Virus, daß dieses im Centralnervensystem immer vorhanden ist und sich in Glycerin ebenso bewahren läßt wie das Wutvirus, daß man seinen Krankheitserreger weder züchten noch erblicken kann, daß er durch den Filter (Nordtmeyer-Berkefeld) nicht übergeht, alles Eigenschaften, welche an die Wut erinnern können.

Eben darum kann es in der Praxis vorkommen, daß in Fällen, wo der Zeitpunkt der Ansteckung und daher die viel kürzere Inkubation unbekannt ist, wenn die Eingangspforte der Infektion ein mehr verborgener Platz des Körpers ist (z. B. die Schleimhaut der Nase), wenn weiterhin die lokalen Veränderungen geringer sind, daher der Aufmerksamkeit entgehen und nur die heftigen Erregungssymptome des Nervensystems beobachtet werden, ist es möglich, daß der Verdacht sich auf die Wutkrankheit richtet. Dieser Verdacht bekommt noch Kraft, wenn das verendete Tier seciert wird, denn die Veränderungen sind im Kadaver eben so gering und unbestimmt wie bei der Wutkrankheit. Ich betone aber nochmals, dieser Irrtum ist nur dann möglich, wenn die lokalen Veränderungen am Orte der Infektion wegen ihrer geringeren Ausbreitung, Verborgenheit oder aus anderen Gründen der Beobachtung entgehen.

Aber der experimentelle Tierversuch wird die Sache immmer aufklären. Aus demselben wird es auch klar, daß die hier beschriebene Krankheit der Wut nur in einigen Eigenschaften ähnlich ist und von dieser Krankheit durch mehrere, und zwar wesentliche Eigenschaften sich scharf unterscheidet. Solch ein Unterschied ist in erster Reihe die kurze Inkubation, weiterhin der raschere Verlauf der Krankheit, der Mangel der successiven Lähmung, die Infektiosität des Blutes wie auch der Umstand, daß die subkutane Ansteckung immer gelingt und eine heftige lokale Reaktion (Entzündung) hervorruft. Dagegen erstreckt sich die Inkubation der Wut nicht auf einige Tage, sondern auf Wochen, der Verlauf der Krankheit ist gewöhnlich länger (2—4 Tage), das Blut des wutkranken Tieres ist meistens nicht infektiös und von der subkutanen Verimpfung des virulenten Markes wird die Wut nicht immer (nur in ca. 50 Proz. der Fälle) hervorgerufen; endlich ist bei der Wut meistens keine lokale Reaktion vorhanden, oder wenn eine solche auch auftritt, so ist sie gering und offenbart sich höchstens im Jucken des Impfortes.

Die beschriebene Krankheit unterscheidet sich also durch gewisse Eigenschaften von der Wut scharf, ihr Virus ist mit dem Wutvirus nicht identisch.

Budapest, den 15. Juni 1902.

Sur la pénétration des femelles d'Oxyuris vermicularis à travers les parois de l'intestin.

Par le Dr. **Paul Vuillemin,**
Professeur à la Faculté de Médecine de l'Université de Nancy.

Dans une note du plus haut intérêt, le Dr. Rudolf Kolb[1]) signalait dernièrement la présence de plusieurs *Oxyuris vermicularis* femelles dans la cavité de Douglas d'une femme de 42 ans et la formation de nodules tuberculeux autour des parasites.

Pour l'auteur, il est vraisemblable, il est presque certain que les Oxyures se sont engagés dans les voies génitales et ont suivi le chemin naturellement ouvert de l'intestin à la cavité péritonéale en traversant l'anus, le périnée, la vulve, le vagin, l'utérus et les trompes. La traversée de la paroi de l'intestin lui paraît improbable pour deux raisons: 1) Il n'a trouvé dans la littérature aucune observation permettant de penser que les Oxyures traversent les tissus; 2) la muqueuse rectale n'offrait aucune perforation ni aucune cicatrice de lésion ancienne.

G. Marro[2]) a rencontré chez une femme de 34 ans, morte de paralysie générale, un kyste fibreux situé au contact des franges salpingiennes de la trompe gauche, contenant de nombreux œufs d'Oxyure avec un détritus granulo-graisseux et de la cholestérine. Cette observation s'ajoute à celles que l'auteur invoque pour jalonner le trajet parcouru par les Oxyures à travers les voies génitales.

Une autre observation faite à Nancy par notre collègue le Dr. Froelich[3]) parle au contraire en faveur de l'immigration des femelles d'Oxyure à travers les tissus. Un garçon de onze ans, qui, depuis plusieurs mois, souffrait d'Oxyures intestinaux, présente tout-à-coup, dans le pli interfessier, à 3 cm de l'anus, une tumeur qui atteint, en huit jours, le volume d'une noix, en occasionnant des douleurs modérées et un peu de fièvre. Le sommet de la tumeur est rougeâtre, les bords jaune cuivré; la base est indurée et empiète sur les fesses; la pression est douloureuse; on sent de la fluctuation. Une incision donne issue à du pus renfermant une quantité énorme d'Oxyures très agiles; on en compta 60, mais on négligea de s'assurer du nombre total.

Trente de ces vers, soumis ultérieurement à mon examen, étaient tous femelles[4]).

Cette grande quantité d'Oxyures se trouvait dans une cavité close. Du côté de la peau on n'observait pas trace d'érosion. On chercha vainement une communication entre la cavité du rectum et le fond de l'abcès qui en était séparé par une épaisseur de tissu de 2 cm au moins.

La muqueuse rectale, examinée au spéculum, était rouge, parsemée par places d'un piqueté hémorrhagique. Au niveau de plusieurs de ces points ecchymotiques existaient de petites ulcérations peu profondes,

---

1) Centralbl. f. Bakt. etc. Abt. I. Bd. XXXI. 1902. 3. März.
2) Arch. per le scienze mediche. T. XXV. 1901. No. 2.
3) Revue des maladies de l'enfance. 1897. 8 nov.
4) Nos remarques sur l'observation de Froelich sont mentionnées dans la Thèse de notre élève: Dr. Saba Assénova, Etude sur la provenance des Entozoaires superficiels. Nancy 1899. p. 24 et 119.

dans lesquelles le stylet pénétrait à 1 ou 2 mm. Ces petites anfractuosités existaient aussi bien sur la paroi antérieure que sur la paroi postérieure de l'intestin.

Le malade fut traité par des lavements biquotidiens de liqueur de Van Swieten de 250 g chacun. Au bout d'une quinzaine de jours, le piqueté hémorrhagique avait disparu et les petites ulcérations s'étaient comblées.

L'opinion de Froelich est que nous pouvons rejeter absolument et sans discussion l'idée que les innombrables parasites trouvés dans l'abcès aient émigré tout vivants et adultes de la cavité rectale dans l'abcès. Il ne croit que deux hypothèses possibles: 1) Ou bien une femelle aurait pénétré par une des lacunes ulcéreuses observées dans la muqueuse rectale, et, arrivée dans le tissu cellulaire sous-fessier, aurait pondu les œufs, d'où serait sortie la génération observée dans l'abcès; 2) ou bien une grande quantité d'œufs serait parvenue par la voie lymphatique, grâce aux ulcérations, dans le point où siégeait l'abcès et ces œufs auraient éclos en cet endroit. Ces deux hypothèses sont à rejeter, puisque tous les Oxyures étaient femelles; il est en effet inadmissible que tous les œufs d'une ponte aussi abondante n'aient donné naissance à aucun mâle.

Nous savons que les femelles seules séjournent dans le rectum. Un exode en masse des vers adultes à travers les tissus qui entourent le kyste explique pourquoi tous étaient femelles. Il est improbable qu'ils aient perforé la peau sans attirer l'attention et sans laisser de trace; il reste donc une seule hypothèse vraisemblable: c'est que les Oxyures se sont frayé un chemin à partir de la muqueuse intestinale.

Les petites ulcérations observées au spéculum sont l'œuvre même des Oxyures. Comme les *Ascaris*, les *Oxyuris* attaquent la muqueuse. Mais ces lésions sont fugaces, puisqu'elles ont disparu quelques jours après l'institution du traitement qui a mis fin à l'action irritante des Oxyures du rectum. Voilà pourquoi les altérations analogues, probablement fréquentes, n'ont pas encore attiré l'attention des observateurs.

En résumé, dans le cas du Dr. Froelich, les Oxyures femelles, séjournant dans le rectum, ont érodé la muqueuse, se sont engagés en grand nombre dans les cavités qu'ils avaient creusées et ont pénétré dans le tissu conjonctif. Les fistules microscopiques qui leur ont livré passage se sont immédiatement refermées en raison de l'élasticité des tissus et des réactions inflammatoires. Les ulcérations de la muqueuse avaient disparu peu de temps après.

La même interprétation s'applique à l'origine des Oxyures dans le cas du Dr. Kolb. L'observation de Froelich répond, en effet, aux deux objections du médecin de Prague. 1) Il existe dans la littérature un cas où les femelles adultes parties du rectum ont traversé activement les tissus; 2) les traces de perforation et les cicatrices de la muqueuse intestinale qui en sont les témoins disparaissent rapidement.

Les lésions tuberculeuses observées par Kolb étaient très anciennes et la malade ne présentait plus, comme l'enfant traité par Froelich, la moindre trace d'Oxyures intestinaux. Sur 10 tubercules renfermant des parasites, 2 siégeaient dans le péritoine de la face antérieure du rectum, 3 à la face postérieure de l'utérus. Cette localisation parle aussi en faveur de la pénétration à travers la paroi du rectum.

Conclusion. Il est possible que les Oxyures, dont on a constaté la présence à tous les niveaux des voies génitales de la femme, arrivent par la trompe dans la cavité péritonéale; mais il est démontré que les femelles attaquent la muqueuse intestinale et peuvent traverser une épaisseur de tissu d'un moins 2 cm. Ce trajet suffit pour les amener soit dans le tissu conjonctif sous-cutané où ils déterminent des abcès (cas de Froelich), soit dans la cavité péritonéale où ils deviennent le noyau de nodules tuberculiformes (cas de Kolb).

La constatation de cette action perforante permet aussi d'ajouter l'*Oxyuris vermicularis* à la liste des parasites introducteurs de bactéries.

Die Antikörper des Blutserums mit Blastomyceten behandelter Tiere.

[Aus dem hygienischen Institute der kgl. Universität zu Cagliari.]

Von Prof. **Francesco Sanfelice.**

Aus den Forschungen von Bordet und Gengou[1]) geht hervor, daß die bakteriolytische und cytolytische Eigenschaft eines Serums von einem spezifischen Antikörper herrührt, welchen Bordet als „Sensibilisatrice“, Ehrlich als „Immunkörper“, Metschnikoff als „fixierende Substanz“ oder einfach als „Fixator“ (substance fixatrice, fixateur) bezeichnet, und der neben dem Alexin oder dem nicht spezifischen Komplement Ehrlich's vorhanden ist. Das Serum eines gegen den Pestbacillus immunisierten Pferdes enthält eine sensibilisierende Substanz, welche dem Pestbacillus die Eigenschaft verleiht, das Alexin zu fixieren. Das Gleiche findet mit dem Serum der gegen Milzbrand, Schweinerotlauf, Typhus, Cholera, Proteus u. a. m. immunisierten Tiere statt.

Von den vielen von den Verff. beschriebenen Untersuchungen führe ich vorderhand nur folgende an, weil sie mit denen, die ich zur Entdeckung von Antikörpern im Serum mit Blastomyceten behandelter Tiere angestellt habe, übereinstimmen:

Das Blutserum eines Typhusrekonvalescenten wird eine halbe Stunde lang auf 56° erwärmt; $^{9}/_{10}$ ccm dieses inaktiv gemachten Serums mischt man mit $^{5}/_{10}$ ccm einer Emulsion von Typhusbacillen in physiologischer Kochsalzlösung und mit $^{2}/_{10}$ ccm nicht erhitzten und somit Alexin enthaltenden Serums eines normalen Individuums.

Nach 5 Stunden wird das Alexin durch die Berührung mit den Typhusbacillen fixiert sein, es können daher $^{2}/_{10}$ ccm Serum eines in das subkutane Bindegewebe mit Kaninchenblut geimpften Meerschweinchens, $^{1}/_{2}$ Stunde lang auf 56° erhitzt, zugefügt und mit den roten Blutkörperchen des Kaninchens vermischt werden, ohne daß diese zerstört werden.

Nur in dem Falle, daß das Alexin von den Typhusbacillen nicht fixiert worden wäre, würde eine Zerstörung der Kaninchenblutkörper-

1) Sur l'existence de substances sensibilisatrices dans la plupart des sérums antimicrobiens. (Ann. de l'Inst. Pasteur. 1901. p. 289.)

chen eintreten, da das Alexin durch seine Verbindung mit der sensibilisierenden Substanz dem Meerschweinchenserum gegenüber den Blutkörperchen des Kaninchens die hämolytische Eigenschaft erteilen würde.

Das gleiche Verfahren befolgte ich, um die Gegenwart der Antikörper in dem Serum der mit Blastomyceten behandelten Tiere zu studieren.

Vor allem wollte ich feststellen, ob sich Antikörper in dem Serum von Tieren finden, welche längere Zeit hindurch mit durch Erhitzen abgeschwächten Blastomyceten geimpft und daher gegen endovenöse Einspritzung der virulenten Blastomyceten immunisiert waren.

Zu dieser ersten Versuchsserie wählte ich 4 Hunde, die gegen den Saccharomyces neoformans und den von Plimmer isolierten pathogenen Blastomyceten immunisiert waren. Ein fünfter Hund wurde mit Kulturen eines Blastomyceten behandelt, der aus der Luft isoliert war und auf sterilisierter Kartoffel einen braunen Ueberzug von weniger intensiver Färbung erzeugt, als dies bei den obenerwähnten beiden pathogenen Blastomyceten der Fall ist. Dieser aus der Luft isolierte Blastomycet besitzt für Hunde keine pathogene Eigenschaft. Ich hielt es für angezeigt, zu untersuchen, ob ein nicht pathogener Blastomycet sich bei der Bildung von Antikörpern gleich verhalte wie die pathogenen Blastomyceten.

Der erste und der Reihefolge nach älteste Hund der Serie hatte die erste Impfung mit durch Erhitzen abgeschwächtem Saccharomyces neoformans den 22. Dezember 1900 erhalten. Ein Jahr, nachdem er mit durch Wärme abgeschwächte Kulturen mehrmals behandelt worden war, wurde ihm eine virulente Kultur von Saccharomyces neoformans in die Jugularis eingespritzt, und er überstand die Infektion. In der Folge wurden die Unterhautinjektionen mit abgeschwächten Kulturen des gleichen Blastomyceten fortgesetzt. Im Verlaufe dieses letzten Jahres wurde er zu verschiedenen Malen zu Ader gelassen, um die Eigenschaften des Blutserums zu studieren.

Der zweite Hund der Serie, mit durch Erhitzen abgeschwächten Kulturen des gleichen Blastomyceten subkutan geimpft, wurde vom 25. Januar dieses Jahres bis zum 30. April 9 Injektionen unterworfen. Anfangs Mai erfolgte der Aderlaß zum Studium des Serums. Auch dieser zweite Hund erwies sich als immunisiert gegen endovenöse Impfung mit Saccharomyces neoformans.

Der dritte Hund wurde in den Unterleib mit abgeschwächten Kulturen des pathogenen, nach Plimmer isolierten Blastomyceten geimpft. Während 3 Monaten waren 8 Einspritzungen vorgenommen worden. Auch dieser Hund überlebte die endovenöse Injektion virulenter Kulturen des gleichen Blastomyceten.

Der vierte Hund erhielt subkutane Impfung mit abgeschwächten Kulturen des isolierten Blastomyceten Plimmer's. Während 8 Monaten wurde er 20 subkutanen Einspritzungen abgeschwächter Kulturen unterworfen und überstand gleichfalls die endovenöse Impfung mit der virulenten Kultur.

Dem fünften Hunde wurden in 3 Monaten 12 subkutane Injektionen beigebracht, und zwar mit dem aus der Luft isolieten Blastomyceten. Die Kulturen desselben wurden nicht in der Wärme behandelt, da es sich um einen nicht pathogenen Blastomyceten handelte.

Von den Hunden dehnte ich die Nachforschung nach dem Vorhandensein der Antikörper auch auf das Blutserum von Katzen und

Kaninchen aus, welche wiederholt mit abgeschwächten Kulturen des Saccharomyces neoformans und des pathogenen, isolierten Blastomyceten Plimmer's geimpft wurden.

Die erste Katze erhielt in 1 Monate 7 subkutane Einspritzungen von dem durch Erhitzen abgeschwächten Saccharomyces neoformans.

Die zweite Katze ist in einem Zeitraume von 35 Tagen 5mal in die Bauchhöhle geimpft worden, und zwar mit abgeschwächten Kulturen des gleichen Blastomyceten.

An der dritten Katze wurden im Verlaufe von 40 Tagen 10 subkutane Injektionen durch Hitze abgeschwächter Kurturen des isolierten pathogenen Blastomyceten Plimmer's vorgenommen.

Man fing das Blutserum dieser 3 Katzen auf, nachdem sie die endovenösen Einspritzungen der virulenten Kulturen der gleichen pathogenen Blastomyceten überstanden hatten. Es muß hier bemerkt werden, daß manchmal von den Hunden, welchen Kulturen der pathogenen Blastomyceten in die Vene geimpft worden sind, einige davonkommen, ohne irgend welche pathologische Erscheinung darzubieten, während die auf gleiche Weise und mit den gleichen Kulturen behandelten Katzen ohne Ausnahme sterben, indem sie bindegewebige Neubildungen aufweisen.

Von den Kaninchen, welche mit abgeschwächten Kulturen pathogener Blastomyceten behandelt wurden, hatte das erste im Verlaufe von 20 Tagen 10 Abdominalinjektionen mit durch Erhitzen abgeschwächten Kulturen des Saccharomyces neoformans erhalten; das zweite während 1 Monats 15 subkutane Impfungen mit abgeschwächten Kulturen des nämlichen Blastomyceten; das dritte in 1 Monate 8 Einspritzungen in die Bauchhöhle mit durch Erhitzen abgeschwächten Kulturen des von Plimmer isolierten pathogenen Blastomyceten; das vierte in demselben Zeitraume 20 Impfungen mit abgeschwächten Kulturen des gleichen Blastomyceten.

Nach der Behandlung mit den abgeschwächten Kulturen der pathogenen Blastomyceten wurden alle diese Kaninchen mit den virulenten Kulturen in die Vene geimpft und haben sämtlich die Infektion ohne irgend welche abnorme Erscheinungen überstanden.

Es muß an dieser Stelle bemerkt werden, daß es sowohl unter den Kaninchen als unter den Hunden solche giebt, welche nach der endovenösen Impfung mit pathogenen Blastomyceten, sei es mit dem Saccharomyces neoformans oder mit dem von Plimmer isolierten Blastomyceten, die Infektion ohne abnorme Erscheinungen überwinden.

Das Studium der Eigenschaften des Blutserums vom Standpunkte der Blastomycetenantikörper in den Tieren, welche mittels abgeschwächter Kulturen immunisiert waren, genügte nicht, sondern es mußten die nämlichen Eigenschaften auch an Tieren studiert werden, bei welchen die Infektion in Thätigkeit war.

Zu diesem Zwecke wurden virulente Kulturen des Saccharomyces neoformans und des isolierten Blastomyceten Plimmer's in die Adern von Hunden, Katzen und Kaninchen gespritzt und wenn nach einiger Zeit das Aussehen der Tiere den Beginn der Krankheit anzeigte, das Blutserum gesammelt, um seine Eigenschaften mit Rücksicht auf die Antikörper zu studieren.

Man fing das Blutserum von 4 in aktiver Infektion befindlichen Hunden auf, von denen 2 Adereinspritzungen mit Kulturen von Sac-

charomyces neoformans und 2 mit dem isolierten Blastomyceten Plimmer's erhalten hatten. Das Serum der beiden ersteren wurde nach 35 und 40 Tagen gesammelt, als der eine Alterationen der Augen infolge der Lokalisierung der Parasiten zeigte, und der andere beim Gehen taumelte.

Dem anderen Paare wurde nach 38 und nach 45 Tagen Blut entzogen, als sie auffällig abmagerten und sich nur mit Mühe auf den Beinen hielten.

Wenige Tage nach dem Aderlaß starben alle 4 Hunde mit den charakteristischen Zeichen der diffusen blastomycetischen Infektion, welche ich in meinen früheren Arbeiten beschrieben habe.

Von 3 in aktiver Infektion befindlichen Katzen, deren Serum aufgefangen wurde, hatte die erste endovenöse Einspritzung mit Saccharomyces neoformans, die beiden anderen ebensolche mit Plimmer's isoliertem Blastomyceten erhalten. Die Aderlässe wurden 20, 30 und 32 Tage nach der Impfung vorgenommen. Nach wenigen Tagen starben die Tiere mit dem gewöhnlichen Befund der diffusen Infektion.

3 Kaninchen, mit Saccharomyces neoformans in die Jugularis geimpft, wurden nach 20, 25 und 30 Tagen zu Ader gelassen, als alle drei an den Augen Verletzungen durch Parasitenlokalisation zeigten. Auch bei diesen 3 Kaninchen, die wenige Tage nach dem Aderlaß starben, war der anatomisch-pathologische Befund der einer diffusen blastomycetischen Infektion.

Ich setze nun kurz das Verfahren auseinander, das in Hinsicht auf die Antikörper zum Studium der Eigenschaften des Serums befolgt wurde, und zwar sowohl bei immunen Tieren, als bei solchen, in welchen die Ansteckung in Thätigkeit war.

Vor allem präparierte ich das hämolytische Serum durch 3 im Verlaufe von 15—20 Tagen aufeinander folgende Einspritzungen von 5 bis 6 ccm Hühnerblut in das subkutane Bindegewebe von Kaninchen. Das Blutserum derselben erlangt auf diese Weise hämolytische Eigenschaften gegen die Erythrocyten der Hühner, d. h. wenn diesem Serum die in Normalsalzlösung aufbewahrten Hühnerhämatien zugesetzt werden, so verschwinden diese, mit Ausnahme der intakt gebliebenen Kerne, nach einiger Zeit und erliegen somit dem Phänomen, das man als Hämolyse bezeichnet hat und makroskopisch an der gleichförmig roten Färbung erkennt, welche die Flüssigkeit annimmt. Das hämolytische Kaninchenserum wird $^1/_2$ Stunde lang auf 56° erhitzt und in der Dosis von 20 Tropfen zu 10 Tropfen der Emulsion von Hühnerhämatien in Normalsalzlösung gefügt.

Andererseits werden Emulsionen des Saccharomyces neoformans, des isolierten pathogenen Blastomyceten Plimmer's und des aus der Luft isolierten Blastomyceten in Normalsalzlösung zubereitet; zu 8 Tropfen dieser Emulsionen setzt man 24 Tropfen des $^1/_2$ Stunde auf 56° erwärmten Serums der immunen oder in aktivem Infektionszustande befindlichen Tiere und 4 Tropfen normalen Hunde-, Katzen- oder Kaninchenserums, je nachdem es sich um das Serum der immunen oder in aktivem Infektionsstadium befindlichen Hunde, Katzen oder Kaninchen handelt.

5—6 Stunden nach Herstellung dieser Mischungen setzt man jeder 1 Tropfen des Gemisches von aufgewärmtem hämolytischen Kaninchenserum mit Hühnerhämatien zu.

Zur Kontrolle bereitet man sich aus Mischungen, in welchen das

Serum immuner oder mit aktiver Infektion behafteter Tiere durch solches normaler Individuen der gleichen Tierart ersetzt wird, nachdem es gleich lange der nämlichen Temperatur ausgesetzt war wie jenes.

Waren die Blastomyceten durch einen spezifischen Antikörper sensibilisiert, so absorbieren und fixieren sie das Alexin und die Mischung wird, da sie kein freies Alexin mehr enthält, nicht mehr imstande sein, die Hühnerhämatien zu zerstören, mithin keine Hämolyse oder veränderte Färbung der Flüssigkeit oder Formveränderung der Blutkörperchen herbeiführen.

Ist aber das Gegenteil der Fall und enthält das Serum der immunen oder der in thätiger Infektion begriffenen Tiere keine für die Blastomyceten sensibilisierende Substanz, so verbindet sich das frei gebliebene Alexin mit der sensibilisierenden Substanz des hämolytischen Kaninchenserums und die roten Blutkörperchen werden mit großer Schnelligkeit zerstört.

Aus den zahlreichen Untersuchungen geht hervor, daß in dem Serum der Hunde, Katzen und Kaninchen, welche wiederholt mit abgeschwächten Kulturen pathogener Blastomyceten behandelt und hierdurch gegen die Einimpfung virulenter Kulturen der nämlichen pathogenen Blastomyceten immun gemacht waren, eine sensibilisierende Substanz vorhanden ist und aus diesem Grunde die Hühnerhämatien sich in der Mischung unverändert erhalten.

Vor mir hat Malvoz[1]) eine Reihe von Versuchen nach derselben Methode ausgeführt und ist zu den nämlichen Schlüssen gelangt.

Umgekehrt trifft man im Serum aller Tiere mit aktiver Infektion sowie im Serum der normalen Tiere die sensibilisierende Substanz nicht und daher werden die Hühnerhämatien stets zerstört.

Ich habe die Experimente häufig wiederholt und stets die früheren Resultate erhalten. Diese Methode setzte mich in die Lage, festzustellen, ob von den mit virulenten Kulturen pathogener Blastomyceten in die Vene geimpften Hunden und Kaninchen einige an der Ansteckung sterben oder am Leben bleiben würden. In der That, so oft ich die Gegenwart der sensibilisierenden Substanz nachweisen konnte, blieben die Tiere am Leben, und in allen Fällen, wo ich die sensibilisierende Substanz nicht vorfand, starben sie. Das Serum dieser Tiere sammelte ich 20—30 Tage nach der endovenösen Einspritzung.

Mit den übrigen Eigenschaften des Serums der gegen Blastomyceten immunisierten Tiere beschäftige ich mich in einer anderen Arbeit, deren Veröffentlichung nahe bevorsteht. Hier will ich nur die Bemerkung beifügen, daß im Serum der gegen die Blastomyceten immunisierten Tiere beständig eine Substanz vorkommt, die ich als saccharomycolytische oder blastomycolytische bezeichne und welche das Vermögen besitzt, die Form der Parasiten im Organismus zu modifizieren, bis sie in jene morphologische Varietät übergehen, die zuerst von Russell im Krebs entdeckt und von ihm als Fuchsinkörperchen bezeichnet wurde. Ueber die Modalitäten dieser Umgestaltung handelt meine nächste Arbeit.

Brouha[2]) hat neulich die Eigenschaften des Serums der Krebskranken mit Hinsicht auf die Antikörper der Blastomyceten nach der

1) Malvoz, Le diagnostic de maladies infectieuses par les anticorps microbiens. (Ann. de la soc. méd.-chir. de Liége. 1901.)

2) Brouha, Sur les propriétés du sérum des cancereux au point de vue des anticorps des levures. (Centralbl. f. Bakt. etc. Abt. I. Bd. XXX. 1901.)

gleichen, oben angeführten Methode von Bordet und Gengou studiert und kam zu dem Schlusse, daß es im Serum der Krebskranken keine sensibilisierenden Substanzen für die verschiedenen als Träger des Krebses betrachteten Blastomyceten gebe.

Damit sucht er ohne weiteres die Wichtigkeit der Blastomyceten für die Genesis der malignen Geschwüre zu beseitigen, indem er schreibt: „Ce fait que le sérum de cancereux est dépourvu d'anticorps vis-à-vis de levures isolées de tumeurs épitheliales malignes, est un argument très serieux contre la réalité du rôle étiologique que l'on a voulu faire jouer à ces éléments. On objectera peut-être que les blastomycètes ayant servi aux essais sont différents de ceux qui ont pu provoquer les néoplasies chez les malades dont on a prélevé le sérum. Mais Malvoz, dans ses recherches sur les anticorps des levures, a reconnu que le sérum n'avait pas une spécificité rigoureusement absolue, en ce sens que si le sang agglutine surtout bien l'espèce injectée, il manifeste aussi des propriétés antagonistes pour d'autres espèces de levures: ainsi le sérum des animaux injectés de levure de vin agglutine aussi le blastomyces isolé d'un épithélioma, et réciproquement, constatations qui montrent la parenté étroite de tous ces éléments. Il serait vraiment étrange, d'après ces notions, que le sérum de nos malades n'eussent pas révèlé tout au moins un certain degré de pouvoir agglutinant ou sensibilisant pour l'une ou l'autre des levures mises à l'épreuve, si vraiment les blastomycètes jouent un rôle étiologique dans la production du cancer. Nous conclurons donc qu'en se plaçant au point de vue des propriétés du sérum, le rôle des levures comme agents du carcinome semble de moins en moins probable."

Hätte nun Brouha die Eigenschaften des Blutserums vom Gesichtspunkte der Antikörper der Blastomyceten an irgend einem mit pathogenen Blastomyceten geimpften Tiere studiert, bei welchem die Infektion aktiv gewesen wäre, so würde er gesehen haben, daß das Fehlen sensibilisierender Substanzen im Blutserum der Krebskranken, statt die Wichtigkeit der Blastomyceten für die Genesis des Krebses abzuschwächen, dieselbe im Gegenteil bestärkt.

Aus den oben mitgeteilten Forschungen, zum Zwecke, festzustellen, ob im Blutserum der gegen die Einspritzungen pathogener Blastomyceten immunisierten Tiere oder solcher, bei denen die blastomycetische Infektion ausgebrochen war, Antikörper oder sensibilisierende Substanzen vorhanden seien oder nicht, geht hervor:

1) Im Blutserum der Tiere, die gegen die Einimpfung der pathogenen Blastomyceten durch wiederholte Injektionen in der Wärme abgeschwächter Kulturen der nämlichen Blastomyceten immunisiert waren, findet man stets die sensibilisierende Substanz oder Antikörper, wie Malvoz schon vor mir feststellte.

2) Im Blutserum in aktiver blastomycetischer Infektion begriffener Tiere trifft man die sensibilisierende Substanz oder die Antikörper nicht, ganz wie Brouha bei dem Blutserum der Krebskranken konstatiert hat.

Cagliari, im Mai 1902.

Ueber die gegenseitige Wirkung aufeinanderfolgender Immunisierungen im tierischen Organismus.

[Aus dem Hygiene-Institute der Universität Zürich.]

Von Dr. **Lorenzo Verney.**

(Schluß.)

Ich glaube, daß dieser Fall beim Meerschweinchen A eingetreten ist. Beim Beginne der Untersuchungen zeigte sich eine sichtbare Vermehrung des Gewichtes, trotz der Streptokokkeninjektionen; aber dann fand eine fortgesetzte starke Abmagerung statt, die bewies, daß eine schwere Beeinträchtigung der Gesundheit des Tierchens erfolgt war. Die Verminderung des Gewichtes in diesem Falle ist zu auffällig, als daß sie eine andere Erklärung zulassen würde.

Trotz dieser schweren Beeinträchtigung des Organismus dauerte die für Typhus erworbene Agglutinationsfähigkeit ebenso fort wie beim Meerschweinchen D.

Z. B. am 27. Dezember finden wir für beide Meerschweinchen bei 1 : 250 eine geringe Zahl von beweglichen Bacillen; mit 1 : 1000 entstehen mittlere Häufchen, ein wenig größer bei A als bei D. Mit 1 : 2000 und 1 : 3000 sind die Häufchen klein, bei letzterer Verdünnung wird die Agglutination erst nach 3 Stunden erkennbar und wird nach 4 Stunden nicht deutlicher, die obere Grenze ist somit erreicht. Am 8. Januar ist diese Grenze für D auf 1 : 1500, für A auf 1 : 1000 gesunken; in dieser Verdünnung bemerkt man dann vor 3 Stunden keine deutliche Agglutination. Bei 1 : 250 bleibt in beiden Fällen etwa die Hälfte aller Bakterien frei.

Man kann diese Fortdauer der Agglutinationsfähigkeit gegenüber Typhus mit der Annahme erklären, daß die schwerwiegenden Einflüsse, die der Organismus erlitten hat, nicht die die Typhusagglutinine erzeugenden Zellen betroffen haben; oder, auf jeden Fall, daß die Teile der Zellen, welche die Typhusreceptoren erhalten, keine Veränderung ihrer Konstitution erlitten und daher ihre biologischen Eigenschaften beibehalten haben.

Für die Streptokokken fand in einer Verdünnung von 1 : 10 vor der Injektion wie auch nachher keine Agglutination statt.

Bei der Einwirkung von Streptokokken auf dieses Serum (indem ich mich einer ziemlich konzentrierten, ein einzigesmal centrifugierten Emulsion bediente) besteht die Agglutinationsfähigkeit unverändert fort.

Auf Cholera konnte ich mit 1 : 20 keine Agglutination beobachten; bei 1 : 10 fand eine sehr schwache statt. Am 8. Januar impfte ich dieses Tier mit 1 Tropfen 1 : 40 ccm einer durch Verdünnung einer Agarkultur mit 20 ccm Bouillon erhaltenen und bei 60° sterilisierter Emulsion von Vibr. cholerae. Ich überimpfte eine so geringe Menge wegen der bedeutenden Abmagerung, die das Tier durch die Streptokokkenimpfungen erlitten hatte. Am 21. Januar erhielt es noch 10 Tropfen. am 27. wieder 2 ccm der gleichen Emulsion. Am 29. wog das Tier 365 g, am 31. injizierte ich 3 ccm und am 22. nochmals 3 ccm. — Auch diese Injektion vertrug das Tierchen ziemlich gut.

Die Agglutination gegen Typhus erhielt sich immer ungefähr auf

gleicher Höhe, wie bei dem Kontrolltier, und selbst ein wenig stärker, was sich vielleicht auf individuelle Verschiedenheiten zurückführen läßt. Z. B. am 3. Februar gab A nach 3 Stunden bei 1:100 ein wenig größere Häufchen wie D und bei 1:25 ziemlich große Haufen in beiden Fällen; aber bei A stets ein wenig kompakter, auch fanden sich bei A stets weniger freie Formen. Mit 1:1000 fand bei keinem eine Reaktion statt.

Die Agglutination gegenüber Cholera fehlte am 27. Januar bei 1:25. Mit am 30. entnommenem Serum fand sich bei 1:50 eine schwache Wirkung, mit 1:25 eine deutliche, besonders nach 1 Tage; mit 1:100 keine Agglutination. Mit Serum vom 3. Februar war eine unmittelbar nach Herstellung der Präparate sichtbare Wirkung in den Verdünnungen 1:25 bis 1:300 zu beobachten; sie fehlte vollständig bei 1:500. Nach 2 Stunden sind die Ergebnisse dieselben, jedoch ist die Agglutination noch nicht ausgesprochener. Nach 1 Tage zeigt sich mit 1:25 kein Bacillus mehr beweglich, die Agglutination ist ziemlich ausgeprägt bei 1:100, schwach bei 1:200, wo sich viele bewegliche Formen finden; sie fehlt völlig bei 1:300 und höher. In keinem dieser Fälle sind die Häufchen groß. Ich bediente mich ausschließlich nicht erhitzten Serums, weil, selbst bei einer Verdünnung von 1:25, die Vibrionen nicht aufgelöst sind.

Ich habe nach der letzten Injektion keine Beobachtung mehr gemacht, aber die angegebenen Thatsachen reichen hin, zu beweisen, daß dieses Meerschweinchen unter diesen Bedingungen, d. h. mit intermediärer Injektion von Streptokokken, imstande gewesen ist, agglutinierende Kräfte gegenüber Cholera und Typhus zu erreichen.

Ich muß hier anfügen, daß Widal[1]) ebenfalls beobachtet hat, wie ein Meerschweinchen zu gleicher Zeit gegen Typhus und Cholera agglutinierende Fähigkeiten erwarb. „Cette superposition de double réaction“, sagt er, „peut s'obtenir soit par injection simultanée d'un mélange de culture typhique et cholérique, soit par inocultations successives de ces cultures. L'inoculation de la seconde culture peut être faite alors même que le serum de l'animal en expérience a déjà acquis la réaction agglutinante vis-à-vis de la première.“

II.

Drei Meerschweinchen G, H, J erhielten in verschiedenen Zwischenräumen 11 subkutane Injektionen von 5—6—8 ccm defibrinierten Blutes des Kaninchens. Ich begann diese Versuche lange vor den soeben besprochenen; die letzte Injektion fand am 7. November statt.

Nach der ersten Injektion entstand am Ort derselben eine Infiltration; bei der zweiten bildete sich eine ausgedehnte Nekrose aus, welche von Eiterung begleitet war. Dies kann nicht überraschen. Uhlenhuth[2]) fand analoge Ergebnisse bei der Impfung von Meerschweinchen mit Kaninchenserum. Wegen dieser mit einem Substanzverlust verbundenen Nekrose gebrauchte ich bei den anderen Injektionen Vorsichtsmaßregeln, deshalb setzte ich sie auch einen Monat aus. Die beiden folgenden Injektionen erzeugten gleichfalls Infiltrationen; in der Folge zeigten sich keine Unzukömmlichkeiten mehr.

---

1) Ann. de l'Inst. Pasteur. 1897.
2) Zeitschr. f. Hyg. Bd. XXXVII.

Ich habe für eine lange Zeit immunisiert, um Tiere von beständig hämolytischer Wirkung zu haben,

Um die Hämolyse zu untersuchen, ging ich folgendermaßen vor. Zuerst wusch ich defibriniertes Kaninchenblut 2mal in einer physiologischen Lösung, weil das von den zerdrückten Blutkörperchen stammende Hämoglobin sich in dem Serum auflöst; man konnte also eine Rotfärbung haben und auf Hämolyse schließen, während doch eine solche nicht existiert. Einem Teil solcher Blutkörperchen fügte ich ungefähr einen Teil physiologischer Lösung bei. Für diese Untersuchungen habe ich immer dasselbe Tier benutzt.

Außerdem stellte ich reines, klares Serum von Meerschweinchen her. Dieses Serum verliert nach wenigen Tagen seine hämolytische Wirkung, es behält jedoch die Agglutinationsfähigkeit bei; ich bediente mich deshalb gewöhnlich eines Serums, welches nicht mehr als 3—4 Tage alt war. Ich verdünnte dieses Serum mit physiologischer Lösung auf 1:10 und dann fügte ich auf je 10 Tropfen dieser Lösung einen der vorherigen hinzu. — Ich bereitete Kontrollröhrchen mit Serum eines frischen Tieres und einfacher physiologischer Lösung. Ich begann die Mehrzahl dieser Versuche 10 Tage nach der letzten Injektion.

Beim Anstellen der mikroskopischen Präparate sah man die Kaninchenblutkörperchen in Berührung mit dem hämolytischen Serum ihre zackige Gestalt verlieren und eine wellenförmige annehmen, darauf werden sie alle rund; in derselben Zeit wird ihre Farbe immer heller und zuletzt sieht man sie nicht mehr, wenn man die Blende des Mikroskopes offen hält; bei enger Blende sind die Konturen als sehr feine Linie zu sehen. Ferner vereinigen sich die Körperchen in großer Zahl zu umfangreichen Haufen, indem sie sich aufeinander gelegt und manchmal leicht zusammengedrückt zeigen, so daß ihre Umrahmung nicht mehr kreisförmig ist. Die Agglutination war bei Meerschweinchen G ein wenig stärker als bei den anderen zwei. — Manchmal beobachtet man eine kleine Zahl unveränderter, weder entfärbter, noch agglutinierter Körperchen: vermutlich sind dies Blutkörperchen von Meerschweinchen, die mit dem Serum in das Präparat gelangt sind. — Die beschriebene Hämolyse vollzog sich gleichmäßig gut mit den 3 behandelten Meerschweinchen.

Mit dem Serum eines nicht vorbehandelten Tieres, das zur Kontrolle diente, blieben die Blutkörperchen unverändert, aber man findet kleine Häufchen; in diesen Häufchen sind die Körperchen nicht enge vereinigt. — In der physiologischen Lösung sind die Blutkörperchen unverändert und isoliert.

Makroskopisch sieht man in dem frischen Meerschweinchen und in der physiologischen Lösung, daß die Mischung schnell klar und hell wird, und daß sich die Körperchen am Boden ablagern. — Bei den geimpften Tieren entsteht auch eine Ablagerung von Blutkörperchen, aber die Lösung zeigt sich stark lackrot gefärbt.

Ich habe mich überzeugt, daß bei weiterem Zusatz von Kaninchenblutkörperchen zu dieser Lösung die rote Farbe zunahm, d. h. daß die Hämolyse sich fortsetzen ließ, aber die Färbung ging nicht über eine bestimmte Stärke hinaus, die Hämolyse konnte einen gewissen Grenzwert nicht übersteigen. Es verhielt sich also das hämolytische Serum oder wenigstens einer seiner Bestandteile nicht wie ein Ferment. Die Ergebnisse sind auch dann die gleichen, wenn man an Stelle einer 2maligen Zugabe von Körperchen auf 1mal eine genügend große Menge

zugiebt. Dennoch bemerkt man in mikroskopischen Präparaten dieser beiden Fälle charakteristische Unterschiede.

Wenn man das Blut auf 2mal zu der hämolytischen Lösung giebt, sieht man im Mikroskop neben ganz klaren und runden Blutkörperchen, in denen die Hämolyse stattgefunden hat, vollständig unberührt gebliebene. Hat man aber das Blut auf einmal zugesetzt, sind alle Zellen verändert, aber ihre Kontur ist nicht vollständig rund, ihre Entfärbung ist keine vollständige, man kann sie leichter und mit größerer Blende im Mikroskop erkennen. — Trotz dieser bemerkenswerten Unterschiede im mikroskopischen Aussehen ist die Färbung der Lösung in beiden Fällen eine ganz gleich intensive.

Man kann diese Ergebnisse in einer noch besser sichtbaren Form feststellen, wenn man an Stelle der hämolytischen Serumlösung von 1 : 10 eine solche von 1 : 50 verwendet. Indem man auf 1mal nur eine geringe Zahl von Blutkörperchen verwendet oder indem man 1 oder 2mal diese Zugabe wiederholt oder endlich, indem man sofort eine genügend große Menge von Blutkörperchen hinzufügt, findet man unter dem Mikroskop die gleichen Unterschiede; in dem einen Falle sind alle Körperchen gleichmäßig verändert, in dem anderen Falle zeigen sich neben stark veränderten völlig intakte Körperchen und im 3. Falle nur stark veränderte; die rote Farbe der Flüssigkeit ist aber in allen 3 Fällen gleich schwach.

Also ist eine bestimmte Menge hämolytischer Substanzen in keinem Falle fähig, mehr als eine bestimmte Quantität Hämoglobin aufzulösen. Man muß schließen, daß sich diese Erscheinung unter den gleichen Bedingungen wie chemische Reaktionen vollzieht, was übrigens nur eine Folgerung aus der Theorie Ehrlich's sein wird.

Es wäre von Interesse, sich über diese Thatsache Gewißheit zu verschaffen, bevor man zu weiteren Untersuchungen schreitet. Ich könnte, um die hämolytische Kraft eines Serums zu erkunden, ohne Zaudern einer bestimmten Lösung dieses Serums eine auch excessive Menge Blutkörperchen beimischen und dann nur sehen, ob die Färbung mehr oder weniger dunkel sei.

Ich glaube hier bemerken zu müssen, daß Bordet[1]) analoge Untersuchungen angestellt hat, aber zu anderen Ergebnissen gelangt ist. Er fand nämlich, daß, wenn man auf 1mal eine große Zahl Blutkörperchen mit einem hämolytischen Serum vereinigt, diese Blutkörperchen völlig verschwinden, während sie dies nur teilweise thun, wenn er sie auf 2—3mal zu dem Serum fügte. Nach Bordet war also im ersteren Falle eine größere Menge Hämoglobin in das Serum gelangt als im 2. Falle. Die von ihm gezogenen Schlüsse unterscheiden sich gleichfalls von den von mir erwähnten. Anstatt in diesen Erscheinungen eine einfache chemische Reaktion zu sehen, macht er einen Vergleich zwischen der hämolytischen und der der Färbung. Die von Bordet befolgte Technik ist auch von meiner verschieden: er versetzt direkt das unverdünnte Serum mit den Blutkörperchen des Kaninchens, während ich mich eines in bestimmten Verhältnissen verdünnten Serums bediente, wie es auch Ehrlich thut, wodurch ermöglicht wurde, wie ich glaube, genauere und sichere Resultate zu erhalten[2]).

1) Ann. d. l'Inst. Pasteur. T. XIV.

2) Anmerkung bei der Korrektur: Der Unterschied mit den Bordet-

Bevor ich zu einer weiteren Behandlung meiner Tiere überging, stellte ich fest, daß ihr Serum keine Wirkung auf die Bakterien ausübte, die ich ihnen einimpfen konnte.

Ich begann mit dem Typhus. Ich sah, daß es keine baktericide Wirkung äußerte; jede agglutinierende Wirkung fehlte gleichfalls (bei 1 : 20 und 1 : 10); die Färbbarkeit der Bakterien änderte sich nicht nach der Berührung mit dem Serum. Aber die Mikroorganismen könnten eine Substanz fixieren ohne die Beeinträchtigung ihres Lebens, ohne eine Agglutination oder sichtbare Veränderungen unter dem Mikroskop oder in ihrer Färbung zu zeigen (Bordet und Gengou), deshalb mußten sie diese Substanz verbrauchen. In diesem Falle jedoch sollen sie diese Substanz verschwinden lassen. Wenn dies für den Typhus der Fall wäre, müßte er die Hämolyse verhindern können. Es geschieht nichts dergleichen; das Beisein von Typhus ist ohne Wirkung auf die Hämolyse. — Aber man muß bedenken, daß die Hämolyse vielleicht durch die Bakterien oder die von ihnen erzeugten Produkte veranlaßt sein kann; wir kennen in der That Mikroben, die Hämolyse erzeugen oder die Substanz absondern, die sie hervorbringen; es ist z. B. bei den Staphylokokken der Fall. Ich habe deshalb untersucht, ob der Typhus allein an sich diese Erscheinung hervorbringen kann; aber er zeigte sich ohne Wirkung. — Ferner ließ ich auf hämolytisches Serum gewaschene Typhusbacillen einwirken und centrifugierte es, bevor ich die Blutkörperchen des Kaninchens zugab: das Resultat war das nämliche. Nur wenn gewaschene oder ungewaschene Bakterien anwesend sind, ist die Färbung der Hämoglobinlösung eine etwas dunklere; im Spektroskop zeigt sich jedoch kein Unterschied.

Die Ergebnisse sind mit Streptokokken und Pyocyaneus die gleichen gewesen, nur habe ich keine Schalen verwendet. — Bei Coli und Cholera erhielt ich völlig abweichende Resultate: diese Mikroben haben gezeigt, daß sie imstande sind, Hämolyse zu verhindern. Sie zeigen zwar keine Veränderung in ihrer Farbe und keine andere mikroskopische Veränderung, als daß sie bei 1 : 10 leicht agglutiniert werden; bei 1 : 20 zeigen sie noch Tendenz zur Agglutination: deshalb war es unnütz, Petri'sche Schale anzuwenden, weil die Agglutination die Resultate ändert.

Ich wollte weiterhin noch verfolgen, wie sich der Mechanismus der Wirkung mit Coli vollzieht. Zuerst habe ich gesehen, daß der Coli noch wirkte, wenn man ihn zuvor in physiologischer Lösung gespült hatte. Diese Operation läßt sich schwierig ausführen, weil Coli sich nur langsam ausschleudern läßt. Man führt die Trennung besser durch Dekantieren der Flüssigkeit nach 1—2-tägigem Stehen aus. Bei dem Gebrauche des so gewonnenen Bodensatzes konnte ich wirklich Unterschiede beobachten; es zeigt sich in der That manchmal noch eine Hämolyse, aber ich glaubte, daß der Grund dieser Verschiedenheit darin liegt, daß man so nur eine alte Kultur von Coli benützen kann oder eine zu geringe Menge von Mikroben verwenden.

Nachdem auf 1 : 8—1 : 10 verdünntes und centrifugiertes Serum auf gewaschenes oder ungewaschenes Coli gewirkt hatte, zeigte es

---

schen Resultaten ist wahrscheinlich der Thatsache zuzuschreiben, daß das Phänomen mit einer großen Variabilität sich äußern kann. (Vergl. auch Ehrlich u. Morgenroth, Berl. klin. Wochenschr. 1901. No. 10.)

sich, daß die klare Flüssigkeit, welche bleibt, unfähig zu einer Hämolyse sei.

Ich sagte mir, daß, wenn die hämolytischen Substanzen sowohl gegenüber Coli als gegenüber den Blutkörperchen von Kaninchen Wirkung besäßen, sich die Hämolyse vollziehen müsse, wenn man ein Gemisch dieser beiden mit dem Serum behandeln würde. Es zeigte sich aber keine Hämolyse.

Ich beobachtete, daß, wenn man zu der nach der Einwirkung des Coli und der Centrifugation verbliebenen Flüssigkeit Alexine hinzufügte, sich keine Hämolyse vollzog; also fehlte hier der Zwischenkörper. Dieselbe Thatsache zeigte sich, wenn man statt Alexin den Zwischenkörper zugiebt, also fehlt hier Alexin auch.

Ich hatte die Absicht, das Studium der durch Coli ausgeübten Wirkung weiter zu verfolgen. — Leider mußte ich, als ich dazu im Begriffe stand, diese Arbeit unterbrechen. Uebrigens selbst wenn man erkennt, daß der Coli die hämolytischen Substanzen fixieren kann mit dem gleichen Mechanismus wie die Blutkörperchen des Kaninchens, ist darin nichts Seltsames, denn nach den Ansichten Ehrlich's wird der Zwischenkörper nicht für bestimmte Zellen spezifisch sein, aber für Zellen mit einer bestimmten Konstitution oder, um die Terminologie dieses Gelehrten zu gebrauchen, mit bestimmten Receptoren.

Da sich der Typhus gegenüber den hämolytischen Substanzen vollständig indifferent zeigte, impfte ich mit diesem Mikroben.

Ich beobachtete Meerschweinchen G zur Kontrolle und machte die Impfungen mit den 2 anderen. Dieselben erhielten am 16. Januar 1 ccm, am 21. 2 ccm, am 27. 2 ccm, am 31. 3 ccm und am 4. Februar nochmals 3 ccm einer abgetöteten Typhusemulsion.

Am 23. Januar fanden sich sehr große Haufen mit 1 : 25 und ziemlich große bei 1 : 50 (2'); in dem ersten Falle zeigte sich nach 3 Stunden eine ganz kleine Zahl freier Bacillen, im zweiten Falle mehr als die Hälfte. Die obere Grenze war mit 1 : 200 erreicht. Am 30. Januar waren die Bacillen bei 1 : 100 im Verlaufe von 3 Stunden unbeweglich geworden, die Häufchen waren bei 1 : 250 mittelgroß (3') und relativ wenig Formen blieben beweglich (3'); die obere Grenze war erst mit 1 : 2000 erreicht. Am 2. Januar sind nach 3 Stunden nicht alle Bacillen unbeweglich geworden, die Häufchen waren ziemlich groß, obere Grenze lag bei 1 : 5000; nach 1 Tage zeigte sich nur eine größere Zahl freier Formen. Ich stellte andere Versuche nicht an.

Was die Hämolyse betrifft, zeigte sie sich in den gleichen Tagen der Experimente schwächer als vorher. Bei einer Prüfung mit einer Lösung von 1 : 10, zu der man auf einmal oder in zwei Portionen gewaschene Blutkörperchen giebt, findet man nicht mehr die charakteristische Lackfärbung, von der ich gesprochen habe, jedoch eine schwächere Entfärbung. Bei 1 : 50 fehlt jede makroskopisch wahrnehmbare hämolytische Wirkung.

Diese Veränderungen zeigen sich aber im gleichen Grade bei dem Kontrolltier G; sie sind also nicht durch die Typhusinjektionen bedingt.

Ich bedaure, nicht imstande gewesen zu sein, diese Versuche auszuführen und daher diesen Teil so lückenhaft zu lassen.

[illegible] Lösung [illegible]

[illegible] angenommen [illegible]

[illegible] und in das Innere des [illegible]

[illegible] in der Luft [illegible]

[illegible] einen begrenzten Raum [illegible]

[illegible] behindert sind. [illegible]

[illegible] Berührung; aus der [illegible]

[illegible] wieder trennen, sondern [illegible]

[illegible] Dadurch erklärt sich die Er-

[illegible] wird wahrscheinlicher

[illegible] rasch ein oberflächliches

[illegible] Lösung niemals

[illegible] der unteren Fläche des

[illegible] erklärt werden, daß sich

[illegible] und in noch größerer

[illegible] der Konstitution der

[illegible] suggestiv, von Bordet

[illegible] Agglutination über diese

[illegible] klebrige Konsistenz

[illegible] Lösung wird durch

[illegible] aneinander anziehen.

bedingt. Diese Vermehrung ihrer Kohäsivkraft wird aber begleitet von einer Verminderung der Adhäsivkraft, die auf die Bakterien ausgeübt wird. Daher ziehen sich diese untereinander mit einer relativ größeren Kraft an. Diese relative Kraft ist der Unterschied zwischen der absoluten veränderlichen Atraktivkraft der Bacillen und der Adhäsivkraft, die die Moleküle der Flüssigkeit auf sie ausüben. Unter diesen Umständen können sich die Bacillen, wenn sie einmal in Berührung gekommen sind, ungeachtet ihrer eigenen Bewegung, nicht mehr oder nur schwierig trennen, und bilden so Pseudohäufchen. Eine große Anzahl von Bakterien und ihre etwaige Unbeweglichkeit bei alten Kulturen begünstigt diese Bildungen. — Aus der Entwickelung der Theorie Bordet's geht hervor, daß die Agglutination die Resultierende aus der Konstitution der Bacillen, durch die Vereinigung mit der agglutinierenden Substanz modifiziert, und der Zusammensetzung der umgebenden Flüssigkeit ist. Aber in unserem Falle tritt der letzte Faktor allein in Wirkung, und genügt demzufolge eine Veränderung in der Zusammensetzung der Flüssigkeit, dieses Phänomen zu verhindern. —

Für den Gebrauch der physiologischen Lösung ging ich folgendermaßen vor: Ich verdünnte nicht mehr als 24 Stunden alte Pyocyaneus-Kulturen auf Agar mit physiologischer Lösung und filtrierte durch gewöhnliches Filtrierpapier, um die großen Häufchen zurückzuhalten; das ziemlich bakterienreiche Filtrat benützte ich dann, nachdem ich es erforderlichen Falls noch entsprechend verdünnt hatte. Die Bacillen waren gut isoliert, aber nicht alle und nicht immer gut beweglich; gewöhnlich wurden sie dies später, nach einem mehr oder weniger langen Aufenthalt im Zimmer.

Ich habe gesehen, daß die Agglutination durch die Bruttemperatur begünstigt wurde; sie vollzog sich schneller in Bouillon als in physiologischer Lösung, und besser mit Bacillen, die bereits einen Tag lang sich in physiologischer Lösung, d. h. unter ungünstigen Ernährungsbedingungen, befunden hatten. Doch waren die Unterschiede nicht sehr ausgesprochene. Selbst in starken Konzentrationen zerstörte die Agglutination nicht nur nicht die Lebensfähigkeit der Keime, sondern verhinderte auch nicht eine größere Vermehrung, welche in Bouillon sehr bedeutend werden konnte, besonders wenn die Präparate im Brutschranke waren. Trotz dieser Vermehrung blieben die Bacillen immer stark agglutiniert. Auch bei dem Pyocyaneus entstanden jene charakteristischen Gebilde, die ich beim Typhus beschrieben habe. Die Agglutination steigert sich in den ersten 24 Stunden; dann kann sie mehrere Tage ohne wahrnehmbare Veränderungen bestehen bleiben. In starken Konzentrationen werden alle Bacillen agglutiniert und bleiben selbst nach Tagen unbeweglich, aber in schwächerer Konzentration beobachtet man keine Parallele zwischen Agglutination und Unbeweglichkeit: während die erstere mehrere Tage unverändert andauern kann, erreicht die Unbeweglichkeit der Bacillen bei Zimmertemperatur nach 2—4 Stunden ihr Maximum; später werden die beweglichen Formen zahlreicher und selbst nach einigen Tagen bemerkt man eine gewisse Zahl. Natürlich muß man die wirkliche Beweglichkeit von der Brown'schen unterscheiden; letztere zeigt sich besonders in älteren Präparaten sehr deutlich.

Um die agglutinierende Kraft zu bestimmen, bediente ich mich derselben Kriterien wie bei Typhus und Coli.

III.

Ein Kaninchen M, ca. 2000 g schwer, erhielt am 4. Oktober eine intravenöse Injektion einer Pyocyaneus-Kultur in Bouillon. Es wurde sehr krank, aber erholte sich allmählich wieder.

Ein anderes Kaninchen N von gleichem Gewicht empfing am 8. Oktober eine Injektion von 10 ccm einer Pyocyaneus-Emulsion, die während 30 Min. auf 60° erhitzt und auf ihre Sterilität geprüft worden war. Es entstand ein ausgedehnter Absceß, den ich öffnete; sein Inhalt war kompakt, von rahmartiger Beschaffenheit und weiß; angelegte Kulturen ergaben die Anwesenheit von Pyocyaneus. Es ist übrigens eine bekannte, von Maximowitsch entdeckte Thatsache, daß sich Pyocyaneus, nachdem er der Einwirkung der Wärme ausgesetzt war, in Kulturen steril zeigen kann, dagegen sich im tierischen Körper entwickelt. Am 12. November war das Kaninchen von seinem Absceß geheilt; ich machte darauf an einem entfernten Punkte eine Injektion mit 5 ccm 2mal auf 62° erwärmten Emulsion; trotzdem entstand am Orte des ersten ein neuer Absceß mit weißem Inhalt, in dem wieder Pyocyaneus nachgewiesen wurde. Das Tier magerte sehr ab und wog am 20. November nur noch 1550 g.

Mit beiden Kaninchen konnte eine gut erkennbare Agglutination erzielt werden. Bevor ich aber mit der Beschreibung der quantitativen Versuche fortfahre, will ich berichten, wie ich die verschiedenen Einflüsse auf die Resultate ergründete und beseitigen wollte.

Ich habe mich überzeugt, daß im Gegensatz zu Coli und Typhus der Pyocyaneus in physiologischer Lösung gut beweglich bleibt.

Ich bediente mich daher dieser Lösung, in der sich eine freiwillige Häufchenbildung schwierig zeigt; im Gegenteil, die Kontrollpräparate zeigen oft Pseudohäufchen.

Man könnte diese Thatsache so erklären, daß die Oberflächentension der Bouillon größer ist als die der physiologischen Lösung; demnach können die Bacillen, die an der Oberfläche angekommen sind, nicht den Widerstand derselben durchbrechen und in das Innere des Tropfens zurückkehren, weil ihre Cilien von nun an in der Luft spielen; sie bleiben also an der Oberfläche, wo sie nur einen begrenzten Raum zur Verfügung haben und in ihren Bewegungen behindert sind. Aus der ersteren Ursache kommen sie leicht in Berührung; aus der zweiten können sie sich nach erfolgter Berührung nicht wieder trennen, sondern bleiben durch die Adhäsion vereinigt. Dadurch erklärt sich die Erscheinung von Pseudohäufchen. Diese Erklärung wird wahrscheinlicher gemacht, damit der Pyocyaneus in der Bouillon rasch ein oberflächliches Häutchen bildet, während dies in der physiologischen Lösung niemals der Fall ist; und daß die Häufchen oft an der unteren Fläche des hängenden Tropfens entstehen.

Aber dadurch kann der Umstand nicht erklärt werden, daß sich auch im Inneren der Flüssigkeit Häufchen bilden, und in noch größerer Zahl. Der Grund liegt also auch wohl in der Konstitution der Flüssigkeit selbst. Ich glaube, daß nur die so suggestiv, von Bordet aufgestellte Theorie über den Mechanismus der Agglutination über diese Erscheinung Aufschluß geben kann. Die größere klebrige Konsistenz der Bouillon im Gegensatze zur physiologischen Lösung wird durch die größere Anziehungskraft, die die Molekule aufeinander ausüben,

bedingt. Diese Vermehrung ihrer Kohäsivkraft wird aber begleitet von einer Verminderung der Adhäsivkraft, die auf die Bakterien ausgeübt wird. Daher ziehen sich diese untereinander mit einer relativ größeren Kraft an. Diese relative Kraft ist der Unterschied zwischen der absoluten veränderlichen Atraktivkraft der Bacillen und der Adhäsivkraft, die die Moleküle der Flüssigkeit auf sie ausüben. Unter diesen Umständen können sich die Bacillen, wenn sie einmal in Berührung gekommen sind, ungeachtet ihrer eigenen Bewegung, nicht mehr oder nur schwierig trennen, und bilden so Pseudohäufchen. Eine große Anzahl von Bakterien und ihre etwaige Unbeweglichkeit bei alten Kulturen begünstigt diese Bildungen. — Aus der Entwickelung der Theorie Bordet's geht hervor, daß die Agglutination die Resultierende aus der Konstitution der Bacillen, durch die Vereinigung mit der agglutinierenden Substanz modifiziert, und der Zusammensetzung der umgebenden Flüssigkeit ist. Aber in unserem Falle tritt der letzte Faktor allein in Wirkung, und genügt demzufolge eine Veränderung in der Zusammensetzung der Flüssigkeit, dieses Phänomen zu verhindern. —

Für den Gebrauch der physiologischen Lösung ging ich folgendermaßen vor: Ich verdünnte nicht mehr als 24 Stunden alte Pyocyaneus-Kulturen auf Agar mit physiologischer Lösung und filtrierte durch gewöhnliches Filtrierpapier, um die großen Häufchen zurückzuhalten; das ziemlich bakterienreiche Filtrat benützte ich dann, nachdem ich es erforderlichen Falls noch entsprechend verdünnt hatte. Die Bacillen waren gut isoliert, aber nicht alle und nicht immer gut beweglich; gewöhnlich wurden sie dies später, nach einem mehr oder weniger langen Aufenthalt im Zimmer.

Ich habe gesehen, daß die Agglutination durch die Bruttemperatur begünstigt wurde; sie vollzog sich schneller in Bouillon als in physiologischer Lösung, und besser mit Bacillen, die bereits einen Tag lang sich in physiologischer Lösung, d. h. unter ungünstigen Ernährungsbedingungen, befunden hatten. Doch waren die Unterschiede nicht sehr ausgesprochene. Selbst in starken Konzentrationen zerstörte die Agglutination nicht nur nicht die Lebensfähigkeit der Keime, sondern verhinderte auch nicht eine größere Vermehrung, welche in Bouillon sehr bedeutend werden konnte, besonders wenn die Präparate im Brutschranke waren. Trotz dieser Vermehrung blieben die Bacillen immer stark agglutiniert. Auch bei dem Pyocyaneus entstanden jene charakteristischen Gebilde, die ich beim Typhus beschrieben habe. Die Agglutination steigert sich in den ersten 24 Stunden; dann kann sie mehrere Tage ohne wahrnehmbare Veränderungen bestehen bleiben. In starken Konzentrationen werden alle Bacillen agglutiniert und bleiben selbst nach Tagen unbeweglich, aber in schwächerer Konzentration beobachtet man keine Parallele zwischen Agglutination und Unbeweglichkeit: während die erstere mehrere Tage unverändert andauern kann, erreicht die Unbeweglichkeit der Bacillen bei Zimmertemperatur nach 2—4 Stunden ihr Maximum; später werden die beweglichen Formen zahlreicher und selbst nach einigen Tagen bemerkt man eine gewisse Zahl. Natürlich muß man die wirkliche Beweglichkeit von der Brown'schen unterscheiden; letztere zeigt sich besonders in älteren Präparaten sehr deutlich.

Um die agglutinierende Kraft zu bestimmen, bediente ich mich derselben Kriterien wie bei Typhus und Coli.

Nach einer bestimmten Zeit — etwa 20 Tagen — nach der letzten Injektion blieb die Agglutination bei Kaninchen M stärker als bei N. Z. B. mit 1:3000 war die Agglutination schwach (4—'); mit 1:6000 blieb sie zweifelhaft; die Bewegungen der Bacillen sind nach 2 bis 4 Stunden nur verlangsamt. Für N bei 1:1500 ist die Agglutination schwach (4—5'), mit 1:3000 läßt sich die Agglutination nicht mehr hervorrufen.

In der Folge wurde die Agglutination für beide Tiere gleich. Späterhin zeigte sie sich für N ein wenig höher wie für M. Z. B. machte am 20. Dezember Kanichen N die Bacillen nach 3 Stunden unbeweglich und gab ziemlich große Häufchen, während M noch einige Bacillen beweglich ließ. Mit 1:1000 gab M weniger große und weniger kompakte Häufchen, nach 1 Tag zeigten sich bei M mehr freie Formen als bei N. Beide wirkten noch bei 1:2000, aber N gab besser sichtbare Häufchen; bei 1:3000 wirkte nur mehr N.

Also fand bei N eine nicht nur relative, sondern auch absolute Vergrößerung der Agglutinationsfähigkeit statt. Es läßt sich dies dadurch erklären, daß diese Kaninchen auf dem Abdomen einen von Pyocyaneus bewirkten Absceß hatte, der beständig die durch die Mikroorganismen erzeugten Produkte umwandelte. Die schrittweise Vermehrung der Agglutinationsfähikeit war also eine Reaktion des Organismus auf die durch diese Produkte ausgeübte Reizwirkung. Bei Kaninchen M sank die Agglutinationsfähigkeit fortwährend.

Das Serum des Kaninchens M behielt, ungeachtet der Pyocyaneusinjektionen und der erworbenen Agglutinationsfähigkeit, die baktericide Wirkung gegenüber Milzbrand bei, die dem Kaninchenserum eigen ist.

Ein nicht vorbehandeltes Kontrollkaninchen äußerte eine schwache Agglutinationswirkung gegenüber dem Pyocyaneus. Bei 1:25 entstehen mittlere und kleine Häufchen (3'—4'), wenig kompakt, jedoch zahlreich; mehr als die Hälfte der Bacillen bleibt beweglich; bei 1:50 zeigt sich nur Tendenz zur Häufchenbildung, aber keine deutliche Agglutination mehr.

Auf Typhus äußern die 3 Kaninchen mit 1:20 eine sehr leichte Agglutination. Jede Wirkung fehlt bei 1:50.

Am 20. Dezember wog Kaninchen M 1600 g. Ich injizierte ihm 1,5 ccm einer Emulsion von abgetötetem Typhus. Es magerte stark ab, ohne sehr krank zu erscheinen. Am 27. Dezember wog es nur mehr 1200 g; 9 Tage nach der Injektion, am 29. Dezember, war es tot. Bei der Autopsie fand sich keine Veränderung, außer daß die Nieren ziemlich blaß waren.

Ich prüfte das dem toten Tiere entnommene Serum.

Die Agglutination für Pyocyaneus zeigte sich ungefähr wie vor der Typhusinjektion; eine Agglutination zeigt sich noch bei 1:1500, aber schwach. In Kontrollpräparaten, die mit vor der Typhusinjektion entnommenem Serum hergestellt sind, bemerkt man noch mit 1:2000 eine leichte Agglutination; der Unterschied ist aber nicht bedeutend.

Also schwächt sich die Agglutinationsfähigkeit gegenüber Pyocyaneus trotz der durch den Typhus ausgeübten pathogenen Wirkung nicht.

Gegenüber Typhus zeigt sich die Agglutination sehr deutlich. Bei 1 : 50 und 1 : 100 sind die Bacillen nach 2 Stunden unbeweglich, aber nach 3 Stunden zeigen sich bewegliche, und noch mehr in der Folge. Die Häufchen sind sehr groß. Bei 1 : 250 beobachtet man nach 2 Stunden wenig freie Formen, eine größere Zahl nach 3 Stunden und später noch mehr. Die Häufchen sind groß (2). Bei 1 : 2000 finden sich ziemlich kleine Häufchen.

Trotzdem also das Tier seine Agglutinationsfähigkeit für Pyocyaneus unverändert bewahrt hat, konnte es eine solche auch für Typhus erwerben.

Endlich wollte ich feststellen, ob die vorausgegangene Wirkung auf Typhus die Agglutinationsfähigkeit für Pyocyaneus vermindern würde. Für dieses Experiment stellte ich eine ziemlich starke Aufschwemmung von gewaschenen Typhusbacillen her; zu 25 Tropfen dieser Aufschwemmung setzte ich 1 Tropfen Serum. Die Agglutination vollzog sich sehr schnell. Ich centrifugierte nach 30′, vermengte 10 Tropfen der so erhaltenen Flüssigkeit mit 10 der Suspension und wiederholte die Ausschleuderung. Die klare Flüssigkeit, welche ich mit A bezeichnen will, enthält noch einige nicht agglutinierte Bakterien. Ich bereitete Verdünnungen von dieser Lösung mit Pyocyaneus von 1 : 100 und 1 : 250 her; mit nicht behandeltem Serum verfertigte ich zwei analoge Präparate (1 Tr. Serum und 24 von phys. Lös.; zu einem Tropfen von dieser Mischung fügte ich 1 oder 4 Tropfen von der Pyocyaneus-Emulsion, je nachdem ich die Verdünnung 1 : 100 oder 1 : 250 haben wollte). Ich machte auch 2 Kontrollpräparate mit Lösung A allein.

Ich sah, daß sich die Agglutination mit Lösung A wie mit unbehandeltem Serum gleichmäßig gut vollzog. Nach 3 Stunden fand man mit 1 : 100 sehr große Häufchen und sehr wenig bewegliche Bacillen, bei 1 : 250 sind die Häufchen groß; die beweglichen Bacillen etwas zahlreicher. Nach 1 Tag sind die Ergebnisse in beiden Fällen gleich geblieben, ausgenommen einer etwas größeren Zahl beweglicher Formen. Aber, und besonders nach 2 Tagen, erkennt man auch in den Präparaten, die allein aus Lösung A hergestellt sind, große Häufchen, die aus Typhusbacillen gebildet sind, die sich in dieser Zeit aus den noch in der Lösung enthaltenen entwickelt haben. Dadurch zeigt sich, daß die in der Flüssigkeit vorhandenen Typhusbacillen eine hinreichende Menge von Agglutinin zurückhalten, die die in nicht großer, aber immerhin bemerkenswerten Menge aus ihnen entstehenden Bacillen agglutinieren kann. Dieses Agglutinin kann die Resultate beeinflussen, etwa indem sie auf Pyocyaneus-Bakterien wirkt. Andererseits können die Resultate auch durch die von Typhusbacillen gebildeten Häufchen beeinflußt werden.

Um diese Irrtümer zu vermeiden, führte ich an Stelle der zwei Centrifugationen deren drei aus, d. h. zu der Flüssigkeit, die bereits 2mal in Berührung mit den Bacillen gewesen war, fügte ich nochmals eine Partie Bakterien hinzu und schleuderte sie ein drittes Mal aus. Das letze Mal ließ ich die Bakterien sehr lange mit dem Serum in Berührung, da wir gesehen haben, daß die Agglutination gewöhnlich mit der Zeit zunimmt. Dies kann vielleicht nur eine mechanische Ursache haben: die kleinen Häufchen können sich zu größeren vereinigen und so nur den Anschein einer stärkeren Agglutination erwecken. Aber

es ist auch möglich, daß die Agglutination sich wie manche chemischen Reaktionen sehr langsam vollzieht. In diesem Falle muß man die Einwirkung des Serum auf die Bacillen längere Zeit andauern lassen; ich that dies und zwar bei Zimmertemperatur. Auch vollzog ich die letzte Centrifugation sehr vollständig, um sehr wenig Bacillen in der Lösung suspendiert zu lassen. Endlich benutzte ich nur tote Bacillen, um einer Vermehrung der Individuen, die in der Flüssigkeit geblieben waren, vorzubeugen, und auch zu vermeiden, daß die Pyocyaneus-Agglutinine zu ihrer Ernährung dienen, und auf diese Weise — nicht durch eine einfache Bindung — sie aus der Flüssigkeit verschwinden zu machen.

Auch unter diesen Vorsichtmaßregeln vollzog sich die Agglutination des Pyocyaneus stets und in derselben Stärke wie mit frischem Serum. In der Verdünnung 1:1500 sah man noch ebenso eine Spur von Agglutination wie mit frischem Serum.

Ich halte mich daher für berechtigt zu sagen, daß die Typhusagglutinine und die Pyocyaneusagglutinine des Kaninchens zwei völlig verschiedene Substanzen sind.

Kaninchen N habe ich nicht weiter verfolgt; es erholte sich langsam, ich machte ihm später Injektionen von Coli, die es sehr gut ertrug; aber da ich diese Arbeit abbrach, habe ich sein Verhalten nicht weiterhin untersucht.

Zum Schluß muß ich das Bedauern aussprechen, daß ich eine zu kleine Zahl von Tieren zu meiner Verfügung hatte, und die begonnenen Untersuchungen nicht zu Ende geführt habe. Ein Teil der berichteten Ergebnisse erheischt daher noch eine Nachprüfung. Ich hoffe bald in der Lage zu sein, diese Experimente auf einem beschränkteren Felde wieder aufnehmen zu können.

Während der Dauer dieser Arbeit hatte ich mich der Aufsicht und der Ratschläge des Herrn Dr. W. Silberschmidt zu erfreuen, dem ich hier meinen verbindlichsten Dank ausspreche.

12. Mai 1902.

Anmerkung bei der Korrektur: In einer vor kurzem in der Zeitschrift für Hygiene erschienenen Arbeit von A. Castellani sind einige mit den hier mitgeteilten übereinstimmende Resultate veröffentlicht worden.

The Antihaemolytic Action of Blood Sera, Milk, and Cholesterin upon Agaricin, Saponin, and Tetanolysin, together with Observations upon the Agglutination of Hardened Red Corpuscles[1].

[From the Pathological Laboratory of the University of Pennsylvania.]

By **Hideyo Noguchi,** M. D. in Philadelphia.

In this paper I wish to deal with some of the phenomena of haemolysis as applied to the interpretation of the action of certain biological haemolytic agents yielded by bacteria and the higher plants. The manner of action of haemolytic sera has been greatly elucidated through the investigations of Bordet and Ehrlich and Morgenroth and their successors. That similar factors to those there concerned are also operative in the solution of blood corpuscles caused by several kinds of snake venom has recently been shown by Professor Flexner and myself[2]. That the higher plants yield definite haemolytic agents had previously been demonstrated by Kobert[3] in his studies upon phallin, helvellic and quillajic acids and upon saponin, cyclamin, and solanin. Ehrlich[4] first directed attention through his studies on tetanolysin, to the haemolytic property of bacterial products, and a little later Madsen[5], working under his direction, studied further the action of this substance upon blood corpuscles. The observations of Ehrlich and Madsen upon the bacterial lysogenic agents has been followed by the demonstration in the hands of several other investigators of a similar action of filtrates from typhoid, Pyocyaneus, cholera, and other cultures.

About this time Kraus and Clairmont[6] discovered the antihaemolytic properties of normal blood sera. According to these investigators the antihaemolytic power of normal sera is highly variable and depends on the species of animal as well as the kind of bacterial products used. In some instances the action is very marked. Moreover, besides the variations, due on the one hand to the origin of the serum and on the other to the species of the bacteria, a third difference was noted depending on the origin of the red corpuscles. This antihaemolytic action of serum seems to lack all true specificity in that the protection is not only for its own but also for other corpuscles. This antihaemolytic property possessed by sera led Kraus and Clairmont to the conclusions first, that bacterial products contain many haemolysins active against different red corpuscles; and second, that the antihaemolysins of normal sera are specific and pluralistic.

The study of Kraus and Clairmont recalls the observations of

---

1) This research has been conducted under a grant from the Bache Fund of the National Academy of Sciences.

2) Journal of Experimental Medicine. Vol. VI. 1902. p. 438.

3) Lehrbuch der Intoxikationen. Stuttgart 1893.

4) Berl. klin. Wochenschr. 1898. p. 273.

5) Zeitschr. f. Hygiene. Bd. XXXII. 1899. p. 214—239.

6) Wiener klin. Wochenschr. Bd. XIII. 1900. p. 49; Bd. XIV. 1901. p. 1016.

Camus and Gley[1]), who found that eel's serum and other normal sera when heated to 56° C acquire antihaemolytic properties. While their view that the heat converts the haemolytic into an antagonistic substance is now no longer tenable, the observation itself is certainly correct. That the serum of normal guinea-pigs in capable of paralyzing the action of staphylotoxin was pointed out by Neisser and Wechsberg[2]), and Paul Müller[3]) confirmed Camus and Gley's discovery of the antihaemolytic behavior of heated normal sera as well as that of Neisser and Wechsberg who found a similar action in unheated serum.

Whether the antihaemolytic substances are to be regarded as identical or diverse is a question of importance. Müller believes them to consist sometimes of anti-complements and at others of anti-immune bodies. That still other substances play a part can now be shown.

The observations of Ransom[4]) that cholesterin is capable of protecting red corpuscles from the lysogenic action of saponin is highly important. He found that 0,75 ccm of dog's serum plus 1 mg of cholesterin will neutralize 2 mg of saponin in respect to its action upon red corpuscles. Lecithin, on the other hand, had no such effect. Ransom stated further that he could discover no such protection in respect to other phytolysins, although he neglects to mention the kinds with which failure was obtained.

The present paper is a contribution to our knowledge of the probable nature of some of the antihaemolytic substances contained in normal sera and milk, and the limits of action of cholesterin and lecithin.

Agaricin in relation to haemolysis and antihaemolysis. The haemolytic bodies isolated by Kobert from certain mushrooms (Amanita phalloides and Helvella esculenta) are phallin and helvellic acid respectively. I have found that the white agaric (Boletus laricis, Polyporus officinalis) yields in the form of agaricin a similar haemolytic substance. The agaricin used by me was of Merck's and Boeringer's manufacture. Its activity was not affected by exposure to a temperature of 100° C or by boiling with 1% HCl.

a) Haemolytic action of agaricin. Agaricin dissolved in 0,8% NaCl solution in strengths of 1% per cent and over, causes slight and slow solution of dog's, rabbit's, rat's, and rattlesnake's (Crotalus adamanteus) corpuscles. Weaker solutions are entirely without effect.

Agaricin is very slightly soluble in neutral saline solution, while in such solutions rendered alkaline by means of sodium carbonate or bicarbonate, much greater, although still incomplete solution takes place. Neutralization of the clear filtrate with HCl causes a voluminous precipitate; dilution with normal saline produces no change. For the purpose of testing the action of agaricin a saturated solution in 1% Na_2CO_3 was employed. The smallest quantity (M. H. D.) of this solution capable of causing complete solution of 1 ccm human corpuscles in a 5% suspension, represented about 0,1 mg agaricin. It was noted that

1) Zeitschr. f. Hygiene. Bd. XXXVI. 1901. p. 299.
2) Arch. de pharmacodynamie. T. V. 1898. p. 247—305. — Compt. rend. de la Société de Biologie. T. LIII. 1901. p. 732.
3) Centralbl. f. Bakt. u. Parasitenkunde. Bd. XXIX. 1901. p. 175. 860.
4) Deutsche med. Wochenschr. Bd. XXVII. 1901. p. 194.

in alkaline solution the agaricin is approximately one hundred times as strong as in simple saline solutions.

Sodium bicarbonate solutions of 1 to 2 per cent are haemolytic for certain kinds of corpuscles — dog's and guinea-pig's for example — but the solution is slow as compared with that caused by agaricin. When alkaline solutions of 0,1 % Na_2CO_3 or $NaHCO_3$ are employed no effect is obtained, although agaricin in solution of such strength is still active. Even the stronger simple alkaline solutions are quite or almost without effect on human, ox, pig's, and rabbit's corpuscles. All corpuscles, especially when washed, seem to succumb to the alkaline agaricin solution.

b) Antihaemolytic action of normal sera upon agaricin. Unwashed corpuscles require larger quantities of alkaline agaricin for solution than do the washed corpuscles. That de difference depended on the antihaemolytic action of the serum could be concluded. Experiments directed towards the elucidation of this fact led to the determination that 0,9 ccm of normal serum from any one of several sources will neutralize 1 mg of alkaline agaricin. The next question to arise was as to whether this protective action is specific or whether it acts generally for many kinds of corpuscles.

Alkaline agaricin	1 mg	+ guinea-pig's normal serum	0,9 ccm	+ human red cells	= No haemolysis.
„ „	1 „	+ dog's „ „	0,9 „	+ „ „ „	= „ „
„ „	1 „	+ rabbit's „ „	0,9 „	+ „ „ „	= „ „
„ „	1 „	+ horse's „ „	0,9 „	+ „ „ „	= „ „
„ „	1 „	+ guinea-pig's „ „	0,9 „	+ dog's „ „	= „ „
„ „	1 „	+ horse's „ „	0,9 „	+ „ „ „	= „ „
„ „	1 „	+ rabbit's „ „	(58° C) 0,9 „	+ „ „ „	= „ „
„ „	1 „	+ crotalus „ „	(58° C) 0,9 „	+ „ „ „	= „ „
„ „	1 „	+ human „ „	(58° C) 0,9 „	+ „ „ „	= „ „
„ „	1 „	+ guinea-pig's „ „	(58° C) 0,9 „	+ rabbit's „ „	= „ „
„ „	1 „	+ horse's „ „	(58° C) 0,9 „	+ „ „ „	= „ „
„ „	1 „	+ human „ „	(58° C) 0,9 „	+ „ „ „	= „ „
„ „	1 „	+ dog's „ „	(58° C) 0,9 „	+ „ „ „	= „ „
„ „	1 „	+ „ „ „	(58° C) 0,9 „	+ guinea-pig's „	= „ „
„ „	1 „	+ horse's „ „	(58° C) 0,9 „	+ „ „	= „ „
„ „	1 „	+ rabbit's „ „	(58° C) 0,9 „	+ „ „	= „ „
„ „	1 „	+ human „ „	(58° C) 0,9 „	+ „ „	= „ „
„ „	1 „	+ crotalus „ „	(58° C) 0,9 „	+ „ „	= „ „
„ „	1 „	+ horse's „ „	(58° C) 0,9 „	+ crotalus red „	= „ „
„ „	1 „	+ guinea-pig's „ „	(58° C) 0,9 „	+ „ „ „	= „ „
„ „	1 „	+ rabbit's „ „	(58° C) 0,9 „	+ „ „ „	= „ „

In all cases the controls were haemolysed within five to six minutes.

From these experiments it can be concluded that the action of agaricin upon red corpuscles is neutralized by some substance contained within normal sera. This substance moreover, is not destroyed by heating to temperatures of 100° C. It can equally be concluded that the antihaemolytic substance is without specific action and is as effective against alien as against native corpuscles.

c) Antihaemolytic action of milk upon agaricin. The relations between certain constituents of the serum of milk and the serum of blood led me to test the effect of milk upon agaricin. For these experiments unmodified and skimmed milk and cream were employed separately. To facilitate the microscopical examination a preliminary boiling of thirty minutes was resorted to. On account of the opacity of unmodified milk and cream centrifugalization or sedimentation

must be used to determine the presence and extent of haemolysis. It was determined that 5 ccm of unmodified milk neutralized 2 mg of agaricin; that about 4 ccm of skimmed milk was effective against the same quantity of agaricin, while the cream is almost or entirely without action.

d) The antihaemolytic action of cholesterin upon agaricin. Varying quantities of 1 % ether in solution are mixed with 1 mg of alkaline agaricin and the mixture placed in the thermostat for one hour after which it is boiled in a water bath to drive off the ether. After testing upon a variety of blood corpuscles it was determined that 3 mg of cholesterin will prevent the action of 1 mg of alkaline agaricin upon different red corpuscles.

e) The antihaemolytic action of lecithin upon agaricin. Lecithin as prepared by Merck was employed in the quantities of 3 mg to 5 mg to 2 mg alkaline agaricin. The mixture was permitted to stand for one hour at 37° C before being used.

Lecithin	agaricin	+	red cells	=
Lecithin 3 mg,	agaricin 2 mg	+ rabbit's	red cells	= partial haemolysis.
" 3 "	" 2 "	+ guinea-pig's	" "	= " "
" 3 "	" 2 "	+ human	" "	= " "
" 4 "	" 2 "	+ rabbit's	" "	= trace of haemolysis.
" 4 "	" 2 "	+ guinea-pig's	" "	= " " "
" 4 "	" 2 "	+ human	" "	= " " "
" 5 "	" 2 "	+ rabbit's	" "	= No haemolysis.
" 5 "	" 2 "	+ guinea-pig's	" "	= " "
" 5 "	" 2 "	+ human	" "	= " "

Saponin in relation to the antihaemolytic action of normal sera, milk, cholesterin, and lecithin. The saponin employed in these experiments was of Merck's manufacture and the blood was obtained from man, rabbit, and guinea-pig. In general the blood of the guinea-pig is most susceptible to its action. The activity of saponin is so great that 0,0005 % still causes partial solution. Our experiments upon the neutralizing action of cholesterin and blood serum upon saponin agree with those of Ransom. 2 ccm of several kinds of normal sera neutralize something less than 2 mg of saponin. Skimmed milk delays somewhat but does not prevent the lysogenic action of saponin upon red corpuscles. 3 mg of cholesterin neutralize 1 mg of saponin while lecithin is wholly without protective action, a result also confirmatory of Ransom's observation.

Tetanolysin in relation to the antihaemolytic action of serum, milk, cholesterin, and lecithin. The proof of the non-specific antihaemolytic action of blood serum, milk, cholesterin, and lecithin upon agaricin and saponin led to the extension of this study to tetanolysin as representing the bacterial haemolytic substances. The tetanolysin which I employed was supplied to me through the kindness of Dr. J. J. Kinyoun of Mulford & Co. It is in the form of a dried powder obtained by precipitation of bouillon cultures of Bacillus tetani with $(NH_4)_2SO_4$. The minimum haemolytic dose (M. H. D.) of this precipitate was 0,01 % (0,1 mg in 1 ccm) for the defibrinated and 0,005 (0,05 mg in 1 ccm) for the washed red corpuscles of human blood. Guinea-pig's and dog's corpuscles are slightly less resistant than human corpuscles.

a) Antihaemolytic action of normal sera upon tetanolysin.

Tetanolysin 1 mg	+ guinea-pig's serum	1,2 ccm		+ guinea-pig's	corpuscles	=	No haemolysis.
" 1 "	+ "	" 1,2 "		+ human	"	=	" "
" 1 "	+ "	" 1,2 "	(58° C)	+ dog's	"	=	" "
" 1 "	+ rabbit's	" 1,2 "		+ rabbit's	"	=	" "
" 1 "	+ "	" 1,2 "	(58° C)	+ human	"	=	" "
" 1 "	+ "	" 1,2 "	(58° C)	+ guinea-pig's	"	=	" "
" 1 "	+ human	" 1,2 "		+ human	"	=	" "
" 1 "	+ "	" 1,2 "	(58° C)	+ rabbit's	"	=	" "
" 1 "	+ horse's	" 1,2 "		+ human	"	=	" "
" 1 "	+ "	" 1,2 "		+ guinea-pig's	"	=	" "
" 1 "	+ "	" 1,2 "		+ rabbit's	"	=	" "

From the results of these experiments it can be concluded first, that normal serum is protective against tetanolysin and second, that the antihaemolytic property is common to many kinds of corpuscles and lacks specificity.

b) Antihaemolytic action of milk upon tetanolysin. Milk in the proportion of 5 ccm to 1 mg of tetanolysin delayed considerably the lysogenic action. While the control in saline solution was completely dissolved in 5 minutes, the solution in milk was not complete until at the end of one hour.

c) The antihaemolytic action of cholesterin upon tetanolysin. The ethereal solution of cholesterin after admixture with tetanolysin is kept for two hours at 37° C to permit of the evaporation of the ether. Ether alone had no injurious action upon tetanolysin.

In this experiment human and guinea-pig's corpuscles were employed.

Tetanolysin 1 mg	+ cholesterin 1 mg	+ human	corpuscles	=	marked haemolysis
" 1 "	+ " 1 "	+ guinea-pig's	"	=	" "
" 1 "	+ " 2 "	+ human	"	=	Trace of "
" 1 "	+ " 2 "	+ guinea-pig's	"	=	" " "
" 1 "	+ " 2,5 "	+ human	"	=	No "
" 1 "	+ " 2,5 "	+ guinea-pig's	"	=	" "

While these results prove that cholesterin prevents the haemolytic action of tetanolysin upon human and guinea-pig's corpuscles, similar experiments carried out with lecithin showed this substance to be without effect.

The action of haemolysins and agglutines upon hardened red corpuscles. In a recent publication Matthes[1]) states that red corpuscles which have been hardened in Hayem's fluid are still haemolysable by haemolytic sera. I have tested the action of agaricin, saponin, and tetanolysin upon the red corpuscles of man, guinea-pig, and rabbit hardened in Hayem's solution, formalin, and alcohol-ether, but without observing any solution of the red cells or liberation of haemoglobin.

On the other hand, corpuscles hardened in Hayem's solution and formalin are still capable of agglutination with ricin and the venom of the cobra, mocassin, copperhead, and rattlesnake, as well as with normal horse's serum.

Conclusions.

1) Blood sera and milk exert more or less antihaemolytic action against certain phyto-haemolysins and bacterial haemolysins and their action is non-specific.

---

1) Münch. med. Wochenschr. Bd. XLIX. 1902. p. 8.

2) The manner of antihaemolytic action of sera and milk agree with the manner of action of cholesterin and lecithin against these haemolytic agents.

3) It is highly probable that the antihaemolytic action of sera and milk depend either wholly or in part upon their cholesterin constituent.

4) Agaricin contains a haemolytic principle of considerable activity.

5) Hardened red corpuscles may still be agglutinated by ricin, venom-agglutinins and serum-agglutinins.

In conclusion I wish to express my indebtedness to Professor Flexner for his valuable suggestions and guidance during the prosecution of this work.

April 3rd.

Einige Modifikationen von Einrichtungen für bakteriologische Untersuchungen.

Sterilisierbüchsen, Heizung der Brütschränke mit Auerbrennern, elektrischer Heißwassertrichter, ein neuer Wärmwasserapparat und eine Methode zur bakteriologischen Wasseruntersuchung.

Von Prof. Dr. **Theodor Kasparek,** Prag.

Als Vorsteher eines Instituts für Seuchenlehre nahm ich seiner Zeit während der Leitung der wissenschaftlichen Ausstattung meiner Arbeitsräume — mehr von dem Bestreben, mit den mir knapp zur Verfügung stehenden Mitteln auszukommen dazu verführt, als das schon Bestehende verbessern zu wollen — Modifikationen einiger Einrichtungen vor, von welchen mir einige nach 2-jährigem Bestande empfehlenswert erscheinen.

So werden in meinem Laboratorium statt blecherner Sterilisierbüchsen für Pipetten und Petri-Schalen die sogenannten Gleich'schen Schachteln verwendet, welche sich beliebig lang mit gewöhnlichem Messer zuschneiden lassen und auch in allen Größen zu dem billigen Preise von 20 Pfg. à Stück überall erhältlich sind. Diese halten durch $^1/_2$ Stunde im Trockensterilisator eine Hitze von 150° C ganz gut aus und dadurch, daß sie nicht wie die Blechbüchsen rostig werden, haben sie den Vorteil, daß die in ihnen aufbewahrten Pipetten nicht mit Rost beschmutzt werden, wie es in den eisernen Behältern sehr oft geschieht.

Zur Heizung der Brütschränke haben sich die in meinem Laboratorium eingeführten Gasglühlichtbrenner (System Auer) sehr gut bewährt. Für einen 700 ccm im Innenraume fassenden Brutschrank genügt ein Auer-Brenner, welcher mit einem niedrigen, am unteren Ende durchlöcherten Glascylinder (derzeit allgemein gebräuchliche sogenannte Jenaer Form) geschützt ist und sich mit jedem Thermoregulator, ähnlich wie der Mikrobrenner, verbinden läßt. Der Vorteil dieser Heizvorrichtung ist in der ruhigen und gleichmäßigen Wärmequelle zu suchen, wobei die Gleichmäßigkeit der Erwärmung viel weniger durch die Gasdruckschwankungen leidet. So wird bei meinen drei mit Gasglühlicht geheizten Brütschränken die Wärme bereits 2 Jahre durch ohne Benutzung des Gasdruckregulator nur mit Hilfe des Reichert'schen Quecksilberregulators ununterbrochen auf gleicher Höhe erhalten. Außerdem rußt

der Auer'sche Glühlichtbrenner viel weniger, löscht nicht so leicht aus wie die feine und schwankende Flamme der gewöhnlichen Mikrobrenner und beleuchtet außerdem das Zimmer.

Da das Gebäude, in welchem mein Institut untergebracht, mit elektrischer Leitung versehen ist und elektrisch beleuchtet wird, wurde von Herrn Dr. Šejba, Assistenten des Institutes, eine Art von elektrischem Heißwassertrichter konstruiert, welcher ebenfalls sehr leicht und billig zu beschaffen ist und sich zum Filtrieren von Gelatine- und Agarnährböden sehr gut eignet. Derselbe ist ein elektrisch heizbarer und regulierbarer Asbesttrichter, fabriziert aus einigen mit Wasserglas zusammengefügten Lagen von Asbestpapier, in welchen ein gut passender gewöhnlicher Glastrichter gesteckt wird mit einem aus 2—3 Glühlampen konstruierten Rheostaten. Zwischen den einzelnen Lagen von Asbestpapier werden um den Conus des bei unserem Apparate 320 ccm fassenden Asbesttrichters — den Apparat kann man sich selbst in beliebiger Größe konstruieren — ca. 10 m 0,3 mm starken Nickelindrahtes [1]), dessen Windungen durch die einzelnen Asbestlagen voneinander isoliert sind, geführt. Der Trichter befindet sich beim Filtrieren im Ringe eines gewöhnlichen Eisenstatives und ist an seinem oberen Rande mit Einschaltungsschrauben versehen, in welche die beiden Enden des Nickelindrahtes enden. Von diesen wird das eine direkt mit der elektrischen Leitung, das andere mit 2—3 nebeneinander eingeschalteten Glühlampen verbunden, von welchen dann weiter die Leitung zum zweiten Pole des elektrischen Kontaktes führt. Mittels dieser 2 oder 3 nebeneinander verbundenen eingeschalteten Glühlampen wird wie mit einem Rheostaten die Stärke des Stromes, welcher durch die Nickelindrahtwindungen um den Trichter herumgeht, reguliert, wie auch die infolgedessen sich durch das Erhitzen des Nickelindrahtes im Trichter entwickelnde Wärme. Wird nur eine 32 Kerzen starke Glühlampe eingeschaltet, so erwärmt sich in kurzer Zeit die in den Glastrichter gegossene Flüssigkeit, welche von dem trichterförmigen Behälter aus Asbest umgeben ist, auf 42° C. Der Glastrichter, in den gegossen wird, muß in den Behälter gut hineinpassen. Für Agarnährböden werden zwei 32 Kerzen starke Glühlampen eingeschaltet. Dadurch erreichen wir eine Wärme von 60° C. Leuchtet noch eine 16 Kerzen starke Glühlampe dazu, so steigt die Temperatur auf 70° C.

Außer zum Filtrieren von Agar und Gelatine eignet sich dieser Apparat ebenfalls sehr gut beim Plattengießen zum Auflösen des Inhaltes von Agarröhrchen.

So werden 20 ccm Agar im Reagenzglas in 10 Minuten flüssig, ohne früher vorwärmen zu mussen.

Nachdem infolge der Unachtsamkeit des Personals unsere verschieden konstruierten Heißwasserapparate in sehr kurzer Zeit verdorben wurden, die Gasflamme nicht zugleich mit dem Wasserhahn abgedreht wurde, habe ich mit meinem Assistenten einen sehr praktischen, leicht zerlegbaren und einen vor den Unannehmlichkeiten, welche sonst bei Heißwasserapparaten vorkommen, durch seine Konstruktion geschützten Apparat zusammengestellt. Derselbe besteht aus einem offenen kupfernen Mantel, welcher im Durchschnitt eines großen Omega gebogen, ca. 30 cm lang ist und dessen innere Fläche mit einem 28 cm langen Gasbrenner,

---

1) Klein, E., Report on an epidemic of enteric fever in the Borough of worthing. 23. annual Report of the Local Government Board. 1893—94.)

aus einem eisernen Rohr mit 35 Flammen brennend, erhitzt wird. Von außen tröpfelt das Wasser durch ein oberhalb des höchsten Punktes der Mantelkrümmung vielfach durchlöchertes (ca. 40 Oeffnungen) 28 cm langes Wasserleitungsrohr auf die äußere, von innen erhitzte Fläche des Mantels und sammelt sich unten in den Rinnen des Mantels, wo es infolge leichter Biegung der Rinnen gegen die Mitte durch eine mit einem Wasserauslaufhahn verbundene Oeffnung sofort warm abfließt. Um den ganzen Apparat ist der Länge nach ein durchlöcherter Messingmantel befestigt. Außer der erwähnten Vorteile ist der Apparat im Vergleiche zu den eingeführten Apparaten ungemein haltbar; einzelne Bestandteile desselben können sehr leicht ausgewechselt werden und es kann sich, wie z. B. bei den mit Serpentinröhren montierten Apparaten, kein Wassersatz bilden. Der Apparat ist äußerst billig herzustellen und kann nach Angabe von jedem Gasinstallateur verfertigt werden [1]).

Bei der Beschreibung der erwähnten Einrichtungen sei noch der von mir bei bakteriologischen Wasseruntersuchungen praktizierten Methode Erwähnung gethan. Diese besteht, wie die Methode von Klein [2]) und Ströll [3]), im Zurückhalten der Keime der ganzen zur Untersuchung bestimmten Wassermenge durch einen Filter. Während jedoch nach Klein nur die oberflächlich am Berkefeld-Filter haftenden Keime untersucht werden, benutze ich einen kleinen Thonfilter von Reagenzglasform, dessen Inhalt höchstens 5—8 ccm faßt. Längere Thonkerzen lassen sich sehr leicht kürzer schneiden. Das Wasser wird durch die Kerze von innen nach außen filtriert. Ferner ist ratsam, die ganze Wassermenge durch die Kerze ununterbrochen durchzutreiben, da, wenn während des Filtrierens in die Kerze viel Luft getrieben wird, das Wasser dann durch lange Zeit nicht durchgeht. Ist die ganze Wassermenge durch, so bleiben im Filter die Mikroben gerade so vollständig wie im Finkelburg'schen [4]) Sedimentierungsapparate zurück, worauf man die Kerze in einer sterilisierten Reibschale zerreibt, das Pulver mit flüssiger Gelatine oder Agar vermischt und Platten gießt. Dies empfiehlt sich bei stark keimarmen Wasser, da auch die inwendigen Keime im Filter untersucht werden; und bei Untersuchungen auf Milzbrand, welcher bekanntlich bei Untersuchungen anthraxverdächtigen Wassers ziemlich selten nachgewiesen wird, trotzdem doch allgemein angenommen wird, daß diese Seuche auch mit dem Wasser sich verbreitet. Diese Methode versuchte ich eben auch bei Wasseruntersuchungen auf Milzbrand aus drei mit Milzbrand verseuchten Gehöften, wobei das Resultat dieser Untersuchungen nach dieser Methode in allen 3 Fällen negativ ausfiel. Auch die mit Splittern von Kerzen, die durch das anthraxverdächtige Wasser filtriert wurde, geimpften Meerschweinchen blieben am Leben. Bei dieser Gelegenheit stellte ich einen Kontrollversuch an mit künstlich infiziertem Wasser mit äußerst befriedigendem Resultat, welches mich eben bei dieser Gelegenheit zur Erwähnung dieser Methode bewog. Es wurde 1 l Nutzwasser mit 0,1 ccm Anthraxkultur infiziert, gut ver-

1) Beide Apparate sind außerdem beim Ingenieur Harken, Smichow bei Prag, No. 791, Böhmen, zu kaufen.

2) Klein, E., Report on an epidemic of enteric fever in the borough of worthing. (23. annual Report of the Local Government Board. 1893—94.)

3) Ströll, L., Ueber den Nachweis des Typhusbacillus im fließenden Wasser (mittels Glaswollfilter). (Münch. med. Wochenschr. 1892. No. 27.)

4) Finkelburg, K., Ueber einen Befund von Typhusbacillen im Brunnenwasser, nebst Bemerkungen über die Sedimentiermethode der Untersuchung auf pathogene Bakterien in Flüssigkeiten. (Centralbl. f. Bakt. etc. Bd. IX. 1891. p. 301.)

mischt und durch eine bloß 8 ccm fassende Pukal-Kerze filtriert. Ein Splitter von dem Filter wurde einem Meerschweinchen unter die Haut genäht und das Pulver von der zerriebenen Kerze mit Peptonagar vermischt in Petri-Schalen gegossen. Das Meerschweinchen ging in $2^1/_2$ Tagen an Anthrax zu Grunde, an den Platten wuchsen neben anderen Wasserkeimen Anthraxkolonieen. Der Versuch, diese Methode zu Milchuntersuchungen auf Tuberkelbacillen zu benützen, gelang nicht, da nur sehr geringe Milchmengen durch die kleine Kerze durchgingen. Vielleicht ließe sich diese Methode zum Impfen von Meerschweinchen mit größeren Mengen von Sputum, welches im Wasser nach vorherigem Trocknen verrieben und aufgelöst werden könnte, wie auch zum Typhusnachweise im Wasser und Harn benutzen.

Prag, 15. Juni 1902.

Zur Züchtung des Pneumococcus.

Eine bakteriologische Notiz.

[Aus dem bakteriologischen Institut zu Kasan.]

Von Privatdocent **Felix Rymowitsch.**

Jedem, der sich mit experimentellen Forschungen über den Pneumococcus beschäftigt, sind die Schwierigkeiten dieser Arbeit, die von dem schnellen Absterben des Pneumococcus in Kulturen abhängen, bekannt. Stark virulente Kulturen des Pneumococcus, die wiederholt durch den tierischen Organismus passiert und an das saprophytische Leben nicht gewöhnt sind — und solche Kulturen bilden am meisten den Gegenstand des Experimentes — bleiben sehr oft nicht mehr als 36 Stunden, sogar in solch geeignetem Nährboden, wie Rindfleischbouillon, die zur Hälfte mit inaktivem Kaninchenserum gemischt ist, lebensfähig. Und nur die tägliche Uebersaat der Kultur kann das regelmäßige Fortschreiten der Arbeit garantieren.

Daher erlaube ich mir, eine accidentelle Beobachtung mitzuteilen, die ich über das Wachstum des Pneumococcus in hämoglobinhaltigem Nährboden gemacht habe.

Da ich in meinen Arbeiten über die Mikrobiologie des Conjunctivalsackes sehr ausgedehnte Anwendung von dem hämoglobinhaltigen Nährboden mache, den ich in meiner Arbeit über den Koch-Weeks'schen Bacillus [1]) beschrieben, habe ich mich überzeugt, daß die hämoglobinhaltigen Nährböden Eigenschaften, die für die Züchtung des Pneumococcus sehr wichtig sind, in sich bergen. Namentlich bewahrt der Pneumococcus, der auf solch einen Nährboden gesät ist, seine Lebensfähigkeit bei der Temperatur von 36—38° C ca. 6 Wochen. Es genügt, einen Partikel solcher alten Kultur in die Bouillon, dem Kaninchenserum beigemischt ist, einzusäen, um den Pneumococcus wieder üppig vorsprießen zu sehen. Notwendig ist es nur, daß die Kultur, die vor dem Austrocknen geschützt ist, die ganze Zeit im Brutofen bleibt, weil

1) Russ. Arch. f. Pathol., klin. Med. u. Bakt. 1901.

bei der Temperatur des Laboratoriums der Pneumococcus sehr schnell auch in dem hämoglobinhaltigen Nährboden seine Lebensfähigkeit einbüßt. Nicht selten kann man bei Erfüllung aller dieser Bedingungen beobachten, daß der Pneumococcus 2 Monate lang lebendig bleibt.

Eine zweite Eigentümlichbkeit des Wachstums des Pneumococcus auf hämoglobinhaltigem Nährboden bildet die schnelle und starke Veränderung des letzteren; gewöhnlich verliert der Nährboden schon nach 24 Stunden auf der Linie der Aussaat und nach einigen Tagen in seiner ganzen Dicke seine Transparenz, nimmt eine graubraune Farbe an und wird weicher. Man kann mit Erfolg diese Eigentümlichkeit des Wachstums des Pneumococcus benutzen in Fällen, wo man den Pneumococcus im Gemische mit anderen Mikroorganismen aufsuchen will, z. B. in den Nachsuchungen über die Anwesenheit des Pneumococcus auf normaler Conjunctiva. In Fällen, wo der Pneumococcus da ist, lenken seine Kolonieen die Aufmerksamkeit des Forschers auf sich durch den sie umringenden Gürtel des veränderten Nährbodens. Selbstverständlich müssen solche verdächtigen Kolonieen unter dem Mikroskope kontrolliert werden, weil die Eigentümlichkeit, das Hämoglobin so zu verändern, auch anderen Mikroorganismen, die sich gelegentlich im untersuchten Gemische befinden, zukommen kann.

Zur Kultivierung des Microsporon furfur und des Microsporon minutissimum.

Von Dr. **Hans Vörner,**
Assistenten an der Klinik für Dermatologie und Syphilis in Leipzig.

Das Achorion Schönleinii, der Favus-Pilz und das Trichophyton tonsurans, der Erreger der unter verschiedenen Namen bekannten, zusammenfassend als Trichophytien bezeichneten Krankheiten sind in ihren bakteriellen Eigenschaften allgemein bekannt, da sie schon häufig auf allen bekannten Nährböden gezüchtet wurden und sich von der Kultur ohne Schwierigkeiten auf den Menschen und auf Tiere überimpfen lassen. Anders verhält es sich mit den zwei folgenden Pilzarten, dem Microsporon furfur und Microsporon minutissimum. In der Sitzung der medizinischen Gesellschaft zu Leipzig vom 18. Juni vorigen Jahres habe ich Reinkulturen dieser Pilze sowie zahlreiche teils gefärbte, teils ungefärbte Präparate, welche aus diesen Kulturen hergestellt waren, demonstriert und auf einen später zu erscheinenden Artikel verwiesen, welcher nähere, ihre Kultivierung betreffende Einzelheiten bringen sollte.

Das Microsporon furfur, welches das Krankheitsbild der Pityriasis versicolor hervorruft, wurde erst im vorigen Jahre von Matzenauer[1]) experimentell von der Kultur auf den Menschen übertragen, nachdem die Wachstumsverhältnisse des Pilzes schon früher von

---

1) Matzenauer, Zur Bakteriologie der Pityriasis versicolor. (Arch. f. Dermat. u. Syph. Bd. LVI. 1901. p. 163.)

Spietschka[1]) genau beschrieben worden waren. Frühere kulturelle Studien wurden von Kotljar[2]), Schlen und Unna[3]) ausgeführt. Trotzdem finden diese Thatsachen in den Lehrbüchern wenig Berücksichtigung, weil die Anzüchtung des Microsporon furfur aus den Schuppen der Pityriasis versicolor nach den bisher üblichen Verfahren nur selten gelingt.

Das Microsporon minutissimum, welches die Ursache der vierten bekannten Schimmelpilzerkrankung auf der Haut darstellt, wurde 1890 von de Michele[4]) aus den Schuppen des Erythrasmas zu züchten versucht. De Michele erhielt 2 Arten auf seinen Nährböden, von welchen er die eine nur für einen Saprophyten, die andere dagegen für den spezifischen Erreger dieser Affektion hielt. Später indessen zeigten Ducrey und Reale[5]), daß die von de Michele erhaltenen Kulturen keine Schimmelpilze, sondern Schizomyceten waren.

Ducrey und Reale züchteten eine große Zahl von Varietäten eines Pilzes, die unter sich kulturell erhebliche Differenzen zeigen. Impfversuche von diesen Kolonieen auf den Menschen fielen negativ aus. Die Pilze waren ubiquitär, kamen nach ihren Beobachtungen sowohl auf gesunder wie auf kranker Haut vor, ja sogar in den Schuppen von Psoriasis und Pityriasis versicolor.

Dieser kurze Hinweis genügt, um zu zeigen, daß die bisherigen Untersuchungen über das Erythrasma nicht derart sind, daß sie die Kulturfähigkeit des Microsporon minutissimum beweisen könnten. So kommt es, daß heute die Ansicht besteht, die Züchtung dieser Pilze auf den künstlichen Nährböden sei schwierig oder unausführbar.

Bei meinen Versuchen, die beiden letztgenannten Pilze zu kultivieren, war es von Anfang an mein Bestreben, einen möglichst passenden Nährboden zu wählen. Die Zahl der bis jetzt für die Züchtung von Schimmelpilzen angegebenen Substrate ist ganz enorm. Die Betrachtung dieser einzelnen Nährböden ergiebt, daß ihre Zusammensetzung in der Hauptsache aus Salzen bezw. Salzgemischen, dann Extraktivstoffen tierischer und pflanzlicher Herkunft in einem gewissen Prozentsatze zum Wasser besteht, oder daß dabei Kohlehydraten, Glycerin, Eiweißen verschiedener Art eine größere Bedeutung zugesprochen wird.

Das Resultat meiner Untersuchungen über den Wert, welchen diese Elemente für den Nährboden hatten, war, wenn ich von Einzelheiten absehe, folgendes: Lösungen einzelner Salze, von Zucker und Glycerin, ebenso Mischungen dieser Elemente, wie die Nährflüssigkeiten von Pasteur und Cohn z. B., Stärkekleister, durchfeuchtete Sägespäne etc., kurz alle eiweißfreien Nährsubstrate waren sowohl für Anzüchtung wie zur Fortkultivierung des Microsporon furfur ungeeignet. Diese

1) Spietschka, Untersuchungen über das Microsporon furfur. (Arch. f. Dermat. u. Syph. Bd. XXXVII. 1996. p. 65.)

2) Kotljar, Morphologie des Microsporon furfur. (Arch. f. Dermat. u. Syph. Bd. XXVI. p. 312. - Wratsch. 1892. No. 42, 43. Ref.)

3) v. Schlen u. Unna, Ueber die Züchtung von Pityriasis versicolor. (Tagebl. der LXII. Versammlung deutscher Naturforscher u. Aerzte. Heidelberg 1880. p. 600 u. 1890.)

4) de Michele, L'eritrasma e il suo parassito. (Giorn. ital. delle sc. med. Anno XII. 1890.)

5) Ducrey e Reale, Contr. allo studio dell' eritrasma. Napoli (Tip. de Angelis Belisario) 1893. — Neuer experimenteller Beitrag zum Studium des Erythrasmas. (Monatsh. f. prakt. Dermat. Bd. XIX. 1894. p. 414.)

Eigenschaft teilt dieser Pilz auch mit dem Achorion Schönleinii und dem Trichophyton tonsurans, während auf diesen Nährböden Bakterien und namentlich Hefe und andere Schimmelpilze recht gut gedeihen.

Die pathogenen Hyphomyceten bedürfen zu ihrer Entwickelung einer gewissen Menge pflanzlichen oder tierischen Eiweißes[1]. Dabei ist der Favus und Herpes tonsurans-Pilz viel anspruchsloser. Sie lassen sich schon auf einfacher Wassergelatine ohne jeden Zusatz, ja zuweilen auf Wasseragar züchten[2]. Das Microsporon furfur dagegen läßt wohl ein Fortzüchten auf Kartoffeln, Rübenscheiben, Brot, Reisbrei etc. zu, ebenso wie es, einmal rein gezüchtet, auf unseren bekannten peptonhaltigen Nährböden gut fortkommt. Indessen ist die Anlage einer Kultur aus Hautschuppen auf diesen Nährböden sehr wenig aussichtsvoll. Das Microsporon furfur wächst auf diesen Nährböden langsamer, während dieselben gleichzeitig günstige Bedingungen für Hautbakterien anderer Natur bieten.

Ein ganz vorzügliches Ergebnis bei der Züchtung dieses Pilzes habe ich mit flüssigem, sterilem Blutserum[3], dem zum Festmachen ein Teil 2—3-proz. Wasseragars zugesetzt wird, erzielt. Während Matzenauer bei Schuppenaussaat auf mehr als hundert Platten nur auf zwei Platten eine Kultur erhielt, waren auf meinen Platten fast auf jeder die Pilze nachweisbar.

Meine sonstigen Beobachtungen über das Microsporon furfur bezüglich des kulturellen Verhaltens stimmen mit denen Matzenauer's vollkommen überein.

Mit der Kultivierung des Microsporon minutissimum, des Erythrasma-Pilzes, machte ich dieselben Erfahrungen bezüglich des Nährsubstrates. Dasselbe ist außer seinen schon erwähnten günstigen Bedingungen für die Entwickelung wegen seiner Durchsichtigkeit recht vorteilhaft, weil es ein frühzeitiges Auffinden der feinen, fädigen Pilzkolonieen sehr erleichtert.

Meine Kulturen von Microsporon minutissimum stammen von 4 Fällen, die ein typisches Erythrasma boten. Beim Anzüchten des Pilzes befolge ich gewisse Regeln. Eine Verimpfung nehme ich nur dann vor, wenn sich in den abgekratzten Schuppen eines verdächtigen Falles im Deckglaspräparate, und zwar bei geeigneter Färbung typische und reichliche Pilze ohne andere sichtbare Beimengungen nachweisen lassen. Das Schuppenmaterial wird nach Reinigen der kranken Stelle mit Wasser und Seife und dann mit Aetheralkohol mit sterilem Messer abgekratzt und in sterilem Gefäße aufgefangen.

Die weitere Behandlung der Schuppen geschah nach Král's[4]

---

1) Aus diesem Grunde ist wohl auch der Versuch, die pathogenen Schimmelpilze auf Humus, der für gewisse Pilzsorten sehr geeignet ist, anzusiedeln, aussichtslos.

2) Bei Uebertragung z. B. von Herpes tonsurans auf Wasseragar habe ich, wenn dieselbe von älteren Kulturen geschah, gewöhnlich kein Wachstum erzielt. Impfte ich dagegen von einer jungen, auf Flußwasserpeptonagar kräftig angetriebenen Kultur, dann beobachtete man, daß der Pilz sehr bald das Substrat durchsetzte in Gestalt eines äußerst feinen, hauptsächlich aus Tiefenmycel bestehenden Netzes von Pilzfäden, welches makroskopisch bei auffallender Beleuchtung kaum wahrnehmbar war.

3) Zur Verwendung kam bei den angestellten Versuchen stets Schweineblutserum, welches, vom hiesigen Schlachthofe entnommen, im Laboratorium der Firma Grübler & Co. fraktioniert sterilisiert wurde.

4) Král, F., Ueber den Pleomorphismus pathogener Hyphomyceten. (Arch. f. Dermat. u. Syph. Bd. XXVII. 1894.)

Vorgange, indem ich die Hautschüppchen mit einer kleinen Quantität steriler Kieselguhr in einem keimfrei gemachten Porzellanmörser zerrieb. Von diesem Materiale wurden Plattenkulturen, durch Aussaat einer kleinen Quantität, wie sie 1—2 Platinösen fassen, in mehreren Verdünnungen angelegt. Je frischer das Schuppenmaterial zur Verarbeitung kommt, desto reichlicher gehen die Pilze an.

Die erste Entwickelung junger Kolonieen zeigte sich gewöhnlich im Brutschranke nach 2 × 24 Stunden, manchmal etwas früher oder später, bei Zimmertemperatur in 3—6 Tagen. Sind viel Saprophyten (fast regelmäßig Kokken, seltener Stäbchen) mit aufgegangen, so ist ein rasches Abimpfen zur Anlage von Reinkulturen erforderlich. Die Platten sind täglich zweimal zu kontrollieren, um sofort bei Entwickelung von Mycelien abzuimpfen, ehe eine größere Ausbreitung von Hautkokken sich bemerkbar macht.

Auf der Platte erscheinen die kleinsten, mit bloßem Auge noch eben sichtbaren Kolonieen als feinste graue Pünktchen. Erreichen sie Stecknadelkopfgröße, so treten sie bei oberflächlichem Sitze schon öfters über den Agar hervor. Der beim Wachstume mehr und mehr über die Oberfläche hervortretende Teil der Kolonie wird allmählich sammetartiger und matter, erscheint immer trockener und nimmt schließlich ein grau-weißliches Aussehen an. Tief im Serumagar sitzende Kolonieen behalten ihre graue Farbe, solange sie noch nicht die Oberfläche erreichen.

Bei Entwickelung zahlreicher Kolonieen auf einer Platte tritt sehr bald Konfluenz ein, die an der Oberfläche in einen dichten Filz übergehen kann. Verimpft man eine kleine Kolonie durch Ausstechen und isoliertes Uebertragen auf eine frische Platte erstarrten Serumagars, so kann man größere Pilzrasen erzielen (bis zu Markstückgröße). Meistens verlieren aber dann die Kulturen ihre kreisrunde Begrenzung, es besteht vielmehr ihre Kontur aus nach außen konvexen Bogensegmenten von verschiedenem Radius.

Größere Kolonieen zeigen öfters im Centrum eine buckelige Erhebung, manchmal um dasselbe einige erhabene Ringe.

Betrachtet man die kleineren Kolonieen unter dem Mikroskop bei schwacher Vergrößerung im durchfallenden Lichte, so erscheint das Centrum der Kolonie ziemlich dunkel, bei auffallendem Lichte stark reflektierend. Der Rand ist durchsichtig und besteht aus schwach sichtbaren, gegen die Peripherie sich auflösenden, feinsten Fasern. Die Natur derselben als Mycelfäden kann man indessen erst bei stärkerer Vergrößerung erkennen. Zu diesem Zwecke habe ich sehr kleine, mit schwacher Vergrößerung sichtbar gemachte Kolonieen aus dem Nährboden ausgehoben, auf einen Objektträger gebracht und mit etwas Glycerinzusatz, ohne die Kolonie zu zerquetschen, unter Deckglasverschluß untersucht.

In ähnlicher Weise habe ich mir auch gefärbte Präparate angelegt. Nach Auflegen der ausgestochenen Kolonie auf den Objektträger wusch ich vorsichtig mit erwärmter Essigsäure den Nährboden aus, trocknete dann das Präparat und färbte nach Loeffler, Gram etc. Bei den sonst üblichen Quetsch- und Zerreibungsmethoden zwischen zwei Objektträgern oder Deckgläschen geht die schöne Anordnung der Pilzfäden ganz verloren. Um größere Kolonieen zu untersuchen, habe ich die in toto mit etwas umgebendem Nährboden ausgehobene Kultur in For-

malin gehärtet, nach Entwässerung in Alkohol in Celloidin oder Paraffin geschnitten.

Bei der Untersuchung ganzer Kolonieen bei starker Vergrößerung läßt sich nur die Randpartie genauer untersuchen. Dieselbe besteht aus Pilzfäden von sehr feiner, verhältnismäßig dünner Beschaffenheit. Ihre Dicke beträgt ca. 0,6—0,9 μ [1]), sie entspricht der Angabe, die andere Autoren über den Durchmesser des Microsporon minutissimum in den Schuppen machen (Weyl, Riehl). Die Fäden zeigen eine feine Septierung, die auch im ungefärbten Präparate deutlich hervortritt. Ihre Struktur ist gleichmäßig; auffallende Einschlüsse habe ich nicht beobachtet. Im ungefärbten Präparate erscheinen die Fäden doppelt konturiert, im gefärbten nehmen sie den Farbstoff gleichmäßig und kräftig an. Der Verlauf der Mycelien ist nie gerade, sondern bildet immer teils schwächere, teils stärkere Kurven. Sie teilen sich dichotomisch, aber in jedem möglichen Winkel. Manchmal laufen die Fäden sogar streckenweise zurück. Scharfwinklige Abknickungen sieht man nie, sondern stets eine mehr oder weniger ausgesprochene Krümmung. Gegen das Centrum zu verdichten sich die Pilzfäden derart, daß bei Untersuchung ganzer Kolonieen ein Unterscheiden der einzelnen Elemente unmöglich ist. An Celloidin- oder Paraffinschnitten dagegen sieht man, daß im Centrum außer den Fäden zahlreiche, aus kleinen Kugeln von der Dicke der Mycelfäden bestehende Gonidien in Haufenform sich vorfinden. Je älter die Kultur ist, desto mehr nimmt die Gonidienbildung zu.

Setzt man die Platten einem häufigen Wechsel zwischen Brütofen- und Zimmertemperatur aus, so kann man sehr frühzeitig und in gesteigertem Maße Gonidienbildung eintreten sehen. Die Gonidienhaufen liegen teils am Ende eines einzelnen Fadens und erscheinen so durch fortwährendes Abschnüren von einzelnen Pilzkugeln entstanden zu sein. An anderen Stellen beobachtet man, daß der Mycelfaden auf eine größere oder geringere Strecke seines Verlaufes zu Gonidien umgewandelt ist, so daß die Kugeln in Kettenform aufgereiht erscheinen. Die Gonidienhaufen entstehen in diesem Falle durch Apposition einer Anzahl solcher Ketten. Wo einmal die Entwickelung von Gonidien zu beobachten ist, scheint sich dieselbe nach allen Richtungen hin fortzusetzen. Am ungefärbten Präparate machen die Gonidien den Eindruck von glänzenden, etwas gelblich schimmernden Kugeln, alle Farben nehmen sie kräftig an.

Bei der ersten Aussaat kann, wenn man frühzeitig genug beobachtet, das Auswachsen von Pilzfäden aus den Schuppen direkt verfolgt werden. Man sucht sich zu diesem Zweck mit schwacher Vergrößerung einzelne Hautschüppchen, die im Nährboden zerstreut und durch ihren Glanz und ihre Felderung kenntlich sind, auf, verfährt wie bei den Kulturen und färbt am besten nach Gram. Die Pilze bleiben so in ihrer natürlichee Lage erhalten. Das Innere der Schüppchen ist mit wirren Pilzfäden, mitunter Gonidienhaufen, dicht erfüllt. Die Fäden setzen sich über den Rand der Schüppchen in die Umgebung nach allen Seiten fort, so daß das Schüppchen an seinem freien Rande wie von einem Strahlenkranze von Mycelien umgeben ist.

Auf Röhrchen überimpft, geht das Microsporon minutissi-

---

1) Weyl, Erythrasma. (Monatsh. f. prakt. Dermat. Bd. III. 1884. p. 33.) — Riehl, Ueber Erythrasma. (Wien. med. Wochenschr. 1884. p. 1248.)

mum in Strichkultur zuerst als eine feine, graue, halbdurchscheinende Linie an. Die Linie nimmt an Breite zu und in der Mitte bildet sich, der Länge des Striches folgend ein hellgrauer bis weißlicher Belag, während der periphere Rand die ursprüngliche Farbe und Beschaffenheit beibehält. Bei Untersuchung des Belages zeigt sich, daß derselbe aus Gonidien und sich schlecht färbenden Mycelien und Detritus besteht, das Microsporon minutissimum bildet also kein eigentliches Luftmycel, wie Herpes tonsurans, sondern der Belag ist offenbar die Folge oberflächlicher Austrocknung der Kultur.

Stichkulturen zeigen nach einigen Tagen feine, glänzende Ausläufer, die nach Wochen das ganze Röhrchen quer durchsetzen können und demselben ein atlasglänzendes Aussehen verleihen. Um den Einstich selbst wächst die Kolonie manchmal dichter in Gestalt eines undurchsichtigen, gelbgrauen Fadens.

Auf Gelatine tritt spätestens nach Verlauf einer Woche um die jungen Kolonieen eine Verflüssigungszone ein. Mit der Zeit, bei kräftigem Wachstum der Kultur wird, wenn auch etwas langsam, die Gelatine vollständig verflüssigt. Wenn es sich um junge, von Serumagar abgeimpfte Kulturen handelte, war die Verflüssigung eine raschere, bei älteren Kulturen, die schon häufig verimpft wurden, trat der Prozeß langsamer ein.

Auf Bouillon und Peptonwasser bildet der Pilz halbkugelige, auf der Oberfläche schwimmende Kolonieen, welche ziemlich langsam wachsen, nach einigen Monaten Erbsengröße erreichen.

Bei Verimpfung auf Kartoffeln und Rübenscheiben bildet das Microsporon minutissimum, je älter die Kultur wird, um so dickere Beläge. Die Oberfläche derselben nimmt dabei eine ganz unregelmäßige Gestalt an, so daß die Kultur in krauser Weise zusammengeschoben erscheint.

An allen Kulturen beobachtet man, daß das Tiefenmycel allmählich etwas dunkler wird, namentlich auf gewissen Nährböden, wie Serum und Kartoffeln, und daß diese selbst gleichfalls eine dunklere Färbung annehmen.

Bei der Ungefährlichkeit des Erythrasmas, da die Affektion sowohl auf Medikamente wie auch spontan wieder verschwinden kann, habe ich an mir und an anderen Personen mit den beschriebenen Kulturen Impfversuche ausgeführt. Auf die gut gereinigte Haut, deren Hornschicht mit einer Staarnadel oder einem Messer etwas aufgeschilfert und rauh gemacht worden war, wurde eine entsprechende Kulturmenge von einer Serumagarplatte oder -röhrchen derb eingerieben und die Stelle, wenn möglich, mit einem feuchten Verbande 2—3 Tage bedeckt.

Der größte Teil dieser Versuche war vergeblich. Vielfach lag dies an dem unverständigen Verhalten der betreffenden Individuen, welche die geimpften Stellen so bald als möglich wegen des häufig eintretenden leichten Juckens mit Wasser und Seife bearbeiteten. Andererseits glaube ich, daß ein Teil dieser Personen wegen subnormaler Trockenheit ihrer Haut nicht für die Entwickelung dieses Pilzes disponiert war.

Bei einem Individuum von blasser und etwas pasteuser Haut dagegen entwickelten sich nach 11 Wochen an der Innenfläche des Oberschenkels, direkt auf der Impfstelle, stecknadelkopf-, dann hanfkorngroße und später noch größere, zum Teil konfluierende Flecke, die, rötlichbraun gefärbt, leicht abschuppten. Nach Abkratzen einzelner Schuppen fanden

sich in denselben bei mikroskopischer Untersuchung typische Elemente von Microsporon minutissimum in großer Menge.

Die Impfung fiel in eine Periode heißer Tage. Eine hohe Lufttemperatur ist für die Entwickelung der Pilze auf der Haut von großer Bedeutung. Hierfür spricht schon das häufigere und stärkere Auftreten der Pityriasis versicolor und des Erythrasmas in der wärmeren Jahreszeit. Man kann wohl annehmen, daß es weniger die Temperaturerhöhung an sich ist, als die durch dieselbe bedingte Lockerung und Durchfeuchtung der Hornzellen infolge der vermehrten Hauttranspiration, welche günstigere Entwickelungsbedingungen für die Pilze schafft. Infolgedessen sind Uebertragungen bei kühlerer Witterung oft erst spät erfolgreich, beziehentlich diagnostizierbar.

Bei Frau R. z. B., welche ich im Herbst vorigen Jahres, und zwar in der Schenkelbeuge, mit Microsporon furfur und in der Achselgegend mit Microsporon minutissimum infiziert hatte, zeigte sich lange keine Veränderung. Im Januar dieses Jahres kam sie auf meine Abteilung im Jakobsspital wegen ausgebreiteter Syphilis und gleichzeitiger Schwangerschaft. Sie blieb mit einer kurzen Unterbrechung wegen eintretender Geburt, die sie wie das Wochenbett auf der Frauenklinik durchmachte, bis Ende Juni im Krankenhause, also unter meiner beständigen Beobachtung. Erst Anfang Juni, als zum ersten Male in diesem Jahre eine längere Periode warmer Tage auftrat, bemerkte ich in der Schenkelbeuge stecknadelkopf- bis hanfkorngroße bräunliche Flecke von Pityriasis versicolor und in der Achselhöhle etwa linsengroße Scheiben von Erythrasma. Bei mir selbst machte ich eine ähnliche Erfahrung. Die im vorigen Jahre mit Microsporon minutissimum geimpfte Schenkelfalte zeigte gleichfalls erst in diesem Jahre einen thalergroßen Herd von Erythrasma, die mit Microsporon furfur auf dem Sternum gemachte Uebertragung wies einige kleine Herde von Pityriasis versicolor auf. Bei Frau R. breitete sich die Pityriasis versicolor in wenigen Wochen über den ganzen Stamm aus, während das Erythrasma beide Achselhöhlen fast ganz erfüllte. Bei mir dagegen zeigte das Erythrasma nur ein träges Wachstum, die Pityriasis versicolor hatte sich auf der Brust zu einer Gruppe von mehreren linsen- bis pfennigstückgroßen Herden entwickelt. Heute, nach etwa 10 Wochen, sind beide Affektionen bereits wieder spontan abgeblaßt und in ihrem Umfange zurückgegangen.

Diese Beobachtungen sprechen dafür, daß nicht bloß das Microsporon furfur, sondern auch das Microsporon minutissimum, rein kultiviert, in geeigneter Weise auf die Haut des Menschen gebracht, das dem betreffenden Pilze entsprechende typische Krankheitsbild erzeugt. Auf welchem Wege indessen die natürliche Uebertragung stattfindet, bleibt dunkel. Wir wissen, daß der Pilz des Herpes tonsurans und des Favus bei verschiedenen Haustieren vorkommt und von diesen nicht selten eine Uebertragung auf den Menschen stattfindet. Meine Versuche, das Microsporon furfur und minutissimum auf Kaninchen und Mäuse zu verimpfen, blieben ohne Ergebnis. Mit Sicherheit habe ich nur das Microsporon furfur außer dem Bereiche der menschlichen Haut in der Wäsche der betreffenden Individuen beobachtet. Schabt man von einem Wollhemde, welches von der hiesigen Bevölkerung auch im Sommer gewöhnlich getragen wird, von der Innenseite ab, so kann man bei Pityriasiskranken in dem gewonnenen

Materiale auch Pilzkugeln und Mycelien entdecken. Verschafft man sich ein Stück eines solchen längere Zeit getragenen Wollhemdes oder läßt man ein Stück Flanell 8—14 Tage über einem Pityriasis versicolor-Herde tragen, legt dann einen Teil desselben in Alkohol, Xylol und schließlich in Paraffin, so erkennt man auf Schnitten nicht nur auf der Oberfläche, sondern auch im Innern zwischen den Wollfäden einzelne Elemente, welche denen des Microsporon in jeder Beziehung gleichen.

Da nach dem von mir angegebenen Verfahren die erste Uebertragung der Pilze der Pityriasis versicolor und des Erythrasmas viel leichter gelingt, als mit den früher geübten Methoden, so glaube ich, daß man auch allgemein, durch Nachprüfung überzeugt, die Ansicht von der Nichtkultivierbarkeit dieser Pilze fallen lassen wird.

Ueber einen bequemen Sektions- und Operationstisch für Laboratoriumsversuchstiere.

Von Dr. **Czaplewski**,
Direktor des bakteriologischen Laboratoriums der Stadt Cöln a. Rh.

Mit 6 Figuren.

Wohl jeder, der Sektionen von kleineren Laboratoriumsversuchstieren auszuführen hatte, ist mit der Aufspannung der Tiere nicht zufrieden gewesen. Bald ließen sich die Pfoten der Tiere auf dem Sektionsbrette nicht ordentlich aufnageln, bald lockerten sie sich bei der Sektion oder der Kadaver verlor nach der Eröffnung durch Entspannung seinen Halt, wodurch die Schnitte unsicher wurden. Außerdem war man nie gegen ein Ueberlaufen der Körperflüssigkeiten geschützt. Aus diesem Grunde und um leichtere Sterilisierbarkeit zu erreichen, habe ich mir Sektionsbretter aus Metall mit besonderen Fixiervorrichtungen herstellen lassen.

Für Kaninchen besteht dasselbe aus einem Zinkblech von 60 cm Länge und 30 cm Breite, welches durch einen aufgebogenen Randstreifen von 4 cm Breite zu einer flachen Wanne ausgestaltet ist. Der äußere Umfang des Randstreifens an der oberen Kante beträgt Länge 62, Breite 32 cm. In dieser Wanne werden die Tiere aufgespannt. Zu diesem Zwecke sind in den 4 Ecken der Wanne je eine schnellwirkende Klemmvorrichtung mit umlegbarem Klemmhebel, wie sie für Rouleaux gebräuchlich sind, angelötet. Noch besser ist es in der Ecke und in ca. 10—20 cm Abstand voneinander an den Längsseiten auf der Mittelfläche der Wanne Metallhaken anzulöten und die Klemmvorrichtung außen an den Ecken des Apparates anzubringen, wobei allerdings die scharfen Kanten der Wanne abgerundet sein müssen[1]).

1) F. und M. Lautenschlaeger hat dieses Sektionsbrett, welches bereits in vielen Laboratorien eingeführt hat, in seinen großen Katalog No. 60 aufgenommen und p. 411 abgebildet. Leider ist die Abbildung nicht ganz richtig, insofern dieselbe die Seitenwände der Wanne perforiert darstellt. Dieselben sollen aber durchaus glatt sein.

Die Pfoten des Tieres werden mittels Laufschlingen, welche am Oberarme resp. Oberschenkel angelegt und dann durch die Klemmvorrichtung gezogen werden, durch einfaches Umlegen derselben fixiert. Es ist dabei möglich, auch während der Sektion den entspannten Kadaver beliebig oft nachzuspannen. Dadurch ist dies Sektionsbrett den älteren Vorrichtungen sehr überlegen. Nach beendeter Sektion werden die Klemmen gelöst, das Tier zur Verbrennung unter den üblichen Vorsichtsmaßregeln herausgehoben, übergeflossenes Blut etc. mit hydrophiler Watte, welche mit langarmiger Pincette gefaßt wird, entfernt und die Wanne nach Bedürfnis mit 10-proz. Lysollösung gefüllt, schließlich gereinigt. Die verunreinigten Wattebäusche sterilisiere ich in dem früher von mir empfohlenen Papin'schen Topf. Die Wannenform ist übrigens von dem Operationstische für Kaninchen nach Malassez (Katalog von F. u. M. Lautenschlaeger. p. 167. Abbildung 467) übernommen[1]).

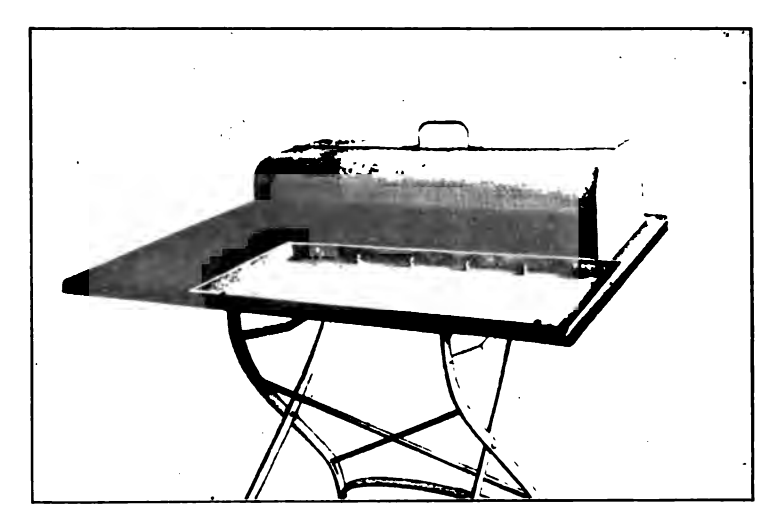


Fig. 1. Sektionsbrett, dahinter der zugehörige Fliegenschutz, beides auf mit Linoleum belegtem eisernen Gartentisch.

Da es mißlich ist, namentlich zur Sommerszeit, gestorbene und gar secierte Versuchstiere an der Luft offen den Insekten ausgesetzt liegen zu lassen, habe ich mir für diese Sektionsbretter einen entsprechend großen Fliegenschutz aus Fliegendrahtgaze mit entsprechenden Stützeinlagen nach Art der Käse etc.-Glocken anfertigen lassen. Ein solches Operationsbrett komplett mit Fliegenschutz wurde mir von F. u. M. Lautenschlaeger für M. 12,00 geliefert.

Diese Sektionsbretter haben sich in der Praxis außerordentlich bewährt und gewährleisten vor allem ein sicheres, gefahrloses und schnelles Arbeiten.

---

1) F. u. M. Lautenschlaeger liefern die Sektionsplatten No. 2097, Katalog 60 für Kaninchen zum Preise von M. 7,50, für Meerschweinchen zum Preise von M. 5,—.

Nachdem ich bei dem Sektionsbrette die außerordentlichen Vorteile der erwähnten Hebelklemmvorrichtung zur Fixierung und schnellen Lösung der Tiere erprobt hatte, habe ich dieselbe Vorrichtung mit womöglich noch größerem Erfolge auf das Tieroperationsbrett übertragen. In der That lassen sich damit die Tiere außerordentlich schnell und sicher fixieren und ebenso leicht wieder lösen.

Das von mir benutzte Operationsbrett ist ursprünglich von der Firma Bühler in Tübingen bezogen. Es besteht aus einem 54 cm langen, 27 cm breiten Brette mit Einschnitt für den Kopf und mit soliden Füßen. Dasselbe, mit nach rechts und links aufschraubbarem eisernen Winkelstücke und verschiebbarer Stativstange versehen, kostete 8,75 M. Dazu gehört ferner ein Tierhalter mit verschiebbarem Excenter für Kaninchen zu 8,50 M. und ein kleinerer Halter (für welchen der gleiche Excenter gebraucht werden kann) für Meerschweinchen zu

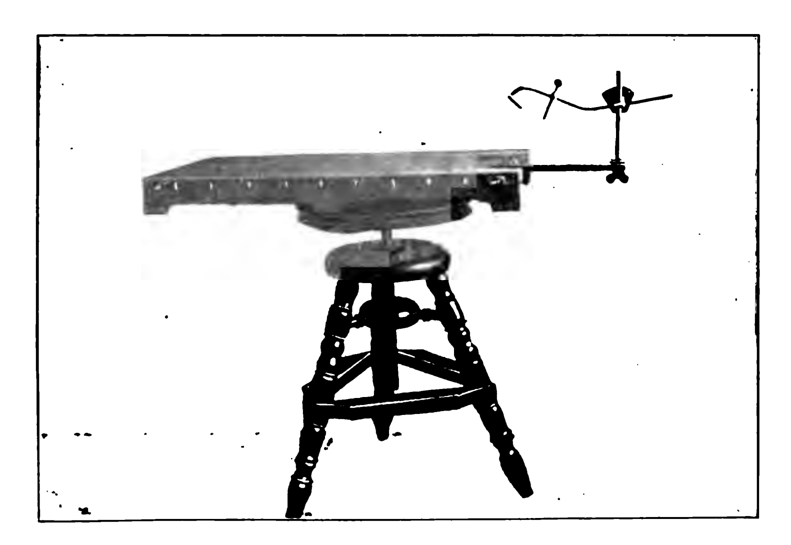


Fig. 2. Operationsbrett von der Seite.

3,50 M. Das Operationsbrett ist also eines der billigsten. Die Tierhalter sind nach dem Modell von Tatin, doch bietet das Bühler'sche Operationsbrett viel größere Vorteile als das Tatin'sche, da die Bewegungen durch den Excenter und das oben erwähnte Winkelstück äußerst mannigfaltig sind[1]). Auch vermag man die erwähnte Stativstange abwärts zu stellen, so daß man bei hängendem Kopfe des Tieres operieren kann.

Nur zweierlei war bei dem Gebrauche des Operationsbrettes, welches mich im übrigen sehr befriedigte, störend, nämlich:

1) Die Fixierung der Pfoten des Tieres erfolgte durch die bekannten Pflöcke, mit welchen die Laufschlingen in Löchern des Brettes festgekeilt wurden, und
2) war das Brett zu schmal und stand daher nicht fest genug.

1) Cf. dazu die Abbildungen des Tatin'schen Operationsbrettes im Lautenschlaeger'schen Kataloge Fig. 469 u. 469a, p. 167.

Diesen Uebelständen habe ich auf folgende Weise abgeholfen. Ich ließ erstens das Operationsbrett mit schwerem Eichenholz so verbreitern, daß es nunmehr 72,5 cm lang und 37 cm breit ist und dabei außen auf 6 Füßen ruht. Dadurch und durch die Schwere des Brettes ist jedes Kippen des Operationsbrettes ausgeschlossen. Nun ist aber das alte Operationsbrett mit der neuen Verbreiterung nicht fest verbunden, sondern in Feder und Nut gleitend (die Nuten im alten Brette) nach vorn noch um 27 cm ausziehbar. Durch dieses Arrangement ist es möglich, auch größere Tiere, wie Hunde, aufzuspannen. Um nun den Auszug beliebig zu fixieren, trägt er auf der Unterseite am hinteren Ende 2 Winkelstücke, welche mittels einer Flügelmutter in in 2 Schienenpaaren, die an der Unterseite des Verbreiterungsbrettes angebracht sind, gleiten und dadurch an jeder gewünschten Stelle festgestellt werden können. Damit auch der Auszug ausgezogen nicht

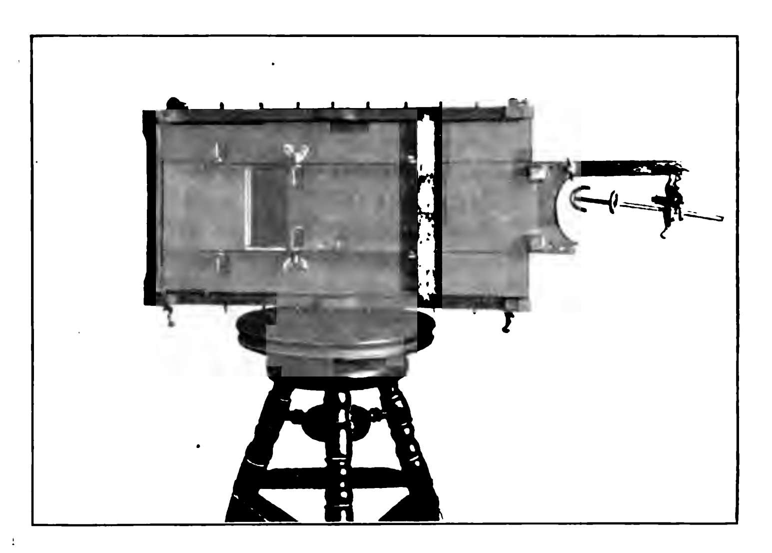


Fig. 3. Operationsbrett, ausgezogen, von unten.

federt, obwohl das bei dem, beiläufig reichlich 2 cm dicken, Brette nicht gut möglich ist, trägt derselbe an dem Kopfende noch 2 Füße. Dadurch steht das Brett absolut sicher. Die Löcher des alten Operationsbrettes (für die Pflöcke) sind mit Pflöcken verleimt, so daß das Brett eine Fläche bildet. Mit Absicht ist jede Durchbohrung des Brettes mit Löchern oder Schlitzen vermieden, bis auf die Nuten des Auszuges.

Wer durchaus eine Metallunterlage für das Tier haben will, mag sich auf den Auszug und dann über das ganze erweiterte Brett noch je eine Zinkblechtafel von 54×27 resp. $72{,}5 \times 36{,}5$ an den Ecken mit 4 Schrauben anmachen lassen. Notwendig ist es gerade nicht.

Was nun die Fixierung der Tiere anlangt, so habe ich an jede Ecke des Brettes auf der Längskante einen Hebelklemmapparat und außerdem in Abständen von je 7 cm nach unten offene Haken aus Messing anbringen lassen.

Bei der Fixierung des Tieres wird zuerst der Kopf in der Tatin-

schen Kopfgabel vorläufig fixiert. Danach werden die Pfoten am Oberschenkel mit den bekannten Laufschlingen gefaßt, die Schlingenenden über den Rand des Brettes geführt, um einen entsprechenden Haken gelegt und durch die noch dazwischen liegenden Haken zu der nächsten (für Vorderpfoten, am Kopfende etc.) geführt und mit dieser festgeklemmt. Dadurch, daß die Schlinge über den Rand des Brettes nach auswärts und dann abwärts geleitet wird, läßt sich das Bein des Tieres direkt fest gegen die Unterlage anpressen, so daß eine vollkommene

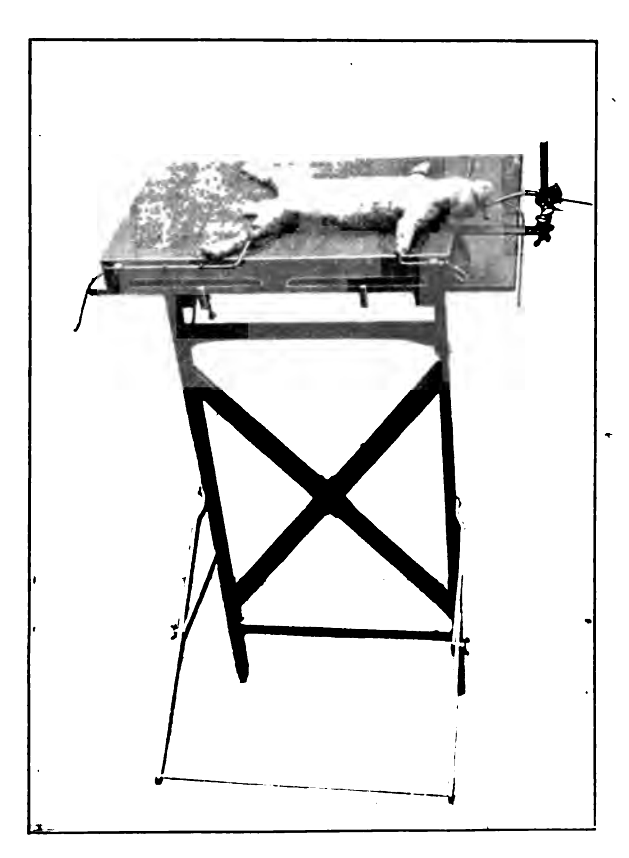


Fig. 4. Operationsbrett mit aufgespanntem Kaninchen, nach vorn geneigt, auf dem Universalklapptische.

Immobilisation erreicht wird. Aufspannen und Lösen der Tiere erfolgt in denkbar kürzester Zeit.

Da das Operationsbrett ein sehr bequemes Arbeiten gestattet und sich dabei verhältnismäßig sehr billig herstellen läßt, glaubte ich dasselbe den Herren Fachgenossen bekannt geben zu sollen.

Bemerken möchte ich noch, daß ich als Operationstisch folgende Vorrichtung bewährt gefunden habe. Ein gewöhnlicher eiserner, zusammenklappbarer Gartentisch wird mit Linoleum belegt (mit Harz aufgeklebt) und die Kanten mit Holzleisten belegt. Die Operationsinstru-

mente werden auf einem kleinen nebenstehenden Glastischchen untergebracht. Solche Tische sind überhaupt für Laboratorien, speziell fliegende und Pestlaboratorien, äußerst empfehlenswert, billig, leicht transportabel und gut desinfizierbar. Als Fenstertische habe ich je 2 unter Abhoblung der Kanten von unten mit dicken Holzleisten zusammenschrauben und dann mit einem gemeinsamen Linoleumbelag und Holzleistenverkleidung zu einem langen Tische vereinigen lassen.



Fig. 5. Operationsbrett mit ausgespanntem Kaninchen, nach vorn geneigt, auf dem Universalklapptische; Operationsbrett ausgezogen, Füße des Tieres nach unten geneigt.

Die vorliegende kurze Mitteilung war am 29. November v. J. abgeschlossen. Inzwischen habe ich als Operationstisch zur Unterlage für das Operationsbrett eine noch zweckmäßigere Vorrichtung kennen gelernt. Es ist dies Atzert's Universalklapptisch[1]). Derselbe ist

---

1) In Köln zu beziehen durch Carl Antoni, Friesenplatz 9, in Alteiche als Stehschreibtisch zu 30 M., dazu 2 Klammern à 1 M. Der übrigens vollkommen zusammenklappbare Tisch ist auch sonst als Protokolltisch, als Arbeitstisch im Labora-

in beliebiger Höhe verstellbar, auch kann die Tischplatte, welche die Größe von 60 $\times$ 90 hat, in beliebigem Winkel geneigt werden. Um das Operationsbrett auf diesem Tische bei geneigter Lage zu befestigen, habe ich auf der Unterseite des Operationsbrettes in entsprechendem Abstande vom Rande 3 Winkelösen ⅂⅃⌈ anschrauben lassen, und zwar eine am Fußende und 2 an der einen Längsseite des Brettes. In diese Winkelösen greifen die zum Tische mitgelieferten Klammern ein,



Fig. 6. Operationsbrett mit aufgespanntem Kaninchen, nach vorn geneigt, auf dem Universalklapptische; Operationsbrett nicht ausgezogen. Kopf des Tieres nach unten geneigt.

Fig. 4—6 sind vom lebenden Tiere mit Zeitaufnahme gemacht worden. Diese Figuren sind also zugleich ein Beweis dafür, daß das Tier dabei vollkommen immobilisiert war.

welche nach Art des Schraubstockes bei einem Laubsägetischchen das Operationsbrett vollkommen fest an die Tischplatte fixieren.

Dadurch ist es möglich geworden, das aufgespannte Tier beliebig zu neigen, mit gesenktem Kopfe oder die Füße nach unten oder quer

---

torium einer vielseitigen Verwendung fähig und nimmt dabei, zusammengeklappt, kaum Raum fort.

eine Seite geneigt. Dies ist z. B. für die Tracheotomie, Blutentnahme aus Carotis und Femoralis bezw. Injektion in diese Gefäße sehr bequem, die letztere Lage für Bauchschnitt. Das Tier wird zunächst auf dem wagerecht stehenden Operationsbrette, wie gewünscht, befestigt, dann das Operationsbrett auf dem wagerecht stehenden Tische mit den Klammern fixiert und erst jetzt die Tischplatte mitsamt dem Operationsbrette in die gewünschte schräge Lage gebracht, worauf die Haltung des Tieres durch Nachziehen der Laufschlingen korrigiert wird.

Den Herren Dr. Hartog und Dr. Jatho, welche so liebenswürdig waren, für mich die Aufnahmen von dem Sektionsbrette und dem Operationstische anzufertigen, bin ich hierfür zu lebhaftem Danke verpflichtet.

Cöln, 8. Juni 1902.

Corrigendum.

Bd. XXXI. p. 761. Zeile 13 v. o. lies „Genese der Krankheit“ statt „Heilung der Krankheit“.

Inhalt.

Originalmitteilungen.

Frommannsche Buchdruckerei (Hermann Pohle) in Jena.

CENTRALBLATT
für
Bakteriologie, Parasitenkunde und Infektionskrankheiten

Erste Abteilung:
Mediz.-hygien. Bakteriologie u. tier. Parasitenkunde

Originale

In Verbindung mit
Geh. Med.-Rat Prof. Dr. Loeffler, Prof. Dr. R. Pfeiffer, Prof. Dr. M. Braun
Greifswald Königsberg i. Pr.
herausgegeben von
Dr. O. Uhlworm in Berlin W., Schaperstr. 2/3 I

Verlag von Gustav Fischer in Jena

XXXII. Band. —— Jena, den 25. September 1902. —— **No. 6.**

Preis für den Band (50 Bogen) 15 Mark. Schwierige Tafeln werden einem Bogen gleich gerechnet. — Die Nummern erscheinen zwanglos je nach dem vorliegenden Stoffe. Bei Einzelverkauf Preis für einen einfachen Druckbogen 40 Pfg., für eine Tafel 60 Pfg.

Hierzu als regelmäßige Beilage die Inhaltsübersichten der II. Abteilung des Centralblattes.

Die Redaktion des „Centralblatts für Bakteriologie und Parasitenkunde" richtet an die Herren Mitarbeiter die ergebene Bitte, etwaige Wünsche um Lieferung von besonderen Abdrücken ihrer Aufsätze entweder bei der Einsendung der Abhandlungen an die Redaktion auf das Manuskript schreiben zu wollen oder spätestens nach Empfang der ersten Korrekturabzüge direkt an den Verleger, Herrn Gustav Fischer in Jena, gelangen zu lassen.

Original-Mitteilungen.

Beiträge zur Kenntnis der anaëroben Bakterien des Menschen.

[Aus dem pathologisch-anatomischen Institute in Wien (Prof. A. Weichselbaum).]

Einleitung.

Von **A. Weichselbaum.**

Bekanntlich sind unsere Kenntnisse über die anaëroben Bakterien, über Morphologie, Biologie und Pathologie derselben, im Gegensatze zu jenen über die Aërobien noch ziemlich mangelhafte. Zwar hat auch in dieser Beziehung die bakteriologische Forschung im Verlaufe der letzten Jahre einige ziemlich bedeutende Fortschritte angebahnt, indem einerseits die Technik der Züchtung der Anaërobien in mehreren Punkten

wesentlich verbessert wurde und andererseits dank dieser Verbesserungen einzelne Anaërobien eine eingehendere Bearbeitung erfahren haben.

Aber es ist kein Zweifel, daß wir noch immer kaum mehr als eine dunkle Vorstellung von der großen Mannigfaltigkeit der Anaërobien besitzen, daß wir daher gar nicht abschätzen können, wie viele Arten von Anaërobien uns noch völlig unbekannt sind und daß selbst bezüglich der Eigenschaften der bereits untersuchten Species unsere Kenntnisse noch mehr oder weniger lückenhafte sind.

Der Grund für den Rückstand unseres Wissens in dieser Richtung ist zweifelsohne vor allem in den Schwierigkeiten zu suchen, auf welche die Züchtung und insbesondere die Isolierung der verschiedenen Arten der Anaërobien bislang gestoßen war. Diese Schwierigkeiten sind aber nicht bloß technischer Natur, sondern sie bestehen teilweise auch darin, daß die bisher gebräuchlichen Methoden für die Züchtung der Anaërobien einen relativ großen Zeitaufwand nebst viel Geduld und Mühe erfordern und vielfach auch mit größeren Kosten verbunden sind.

Gelingt es daher, solche Verbesserungen des Kulturverfahrens ausfindig zu machen, welche die genannten Schwierigkeiten und Hindernisse zu beseitigen oder zu mildern vermögen, so wird dieser Fortschritt sicherlich einen sehr günstigen Einfluß auf die Erforschung der Anaërobien ausüben, und bei dem Umstande, daß in einer Reihe von pathologischen Prozessen beim Menschen unzweifelhaft Anaërobien eine wichtige Rolle spielen, auch die Kenntnis dieser Zustände wesentlich fördern.

Die Thatsache, daß dem Wiener pathologisch-anatomischen Institute ein Material zu Gebote steht, welches gerade ein genaues Studium der Anaërobien sehr wünschenswert macht, hat den Anstoß gegeben, daß in dem genannten Institute schon seit längerer Zeit eingehende Untersuchungen über Anaërobien angestellt wurden, auf Grund welcher bereits zu einigen bakteriologischen und pathologisch-anatomischen Fragen Stellung genommen werden konnte (siehe die Arbeiten von Lindenthal[1]), Hitschmann und Lindenthal[2]) und P. Albrecht[3]).

Auch neuerdings sind eine Reihe von Untersuchungen über Anaërobien teils abgeschlossen, teils noch im Gange. Es besteht deshalb die Absicht, über diese Untersuchungen der Reihe nach und in dem Maße, als sie zu einem Abschlusse kommen werden, in eingehender Weise zu berichten, wobei besonders jene Punkte hervorgehoben werden sollen, welche für die Diagnose der untersuchten Arten und für das Verständnis ihrer Wirkung von Wichtigkeit sind.

Es erscheint dieser Plan auch deshalb gerechtfertigt, weil gerade in jüngster Zeit einige einschlägige Arbeiten erschienen sind, die infolge ihrer unzulänglichen Ausführung und fehlerhaften Untersuchungsmethodik

---

1) Lindenthal, Th. O., Zur Aetiologie der sogenannten Kolpohyperplasia cystica. (Wien. klin. Wochenschr. 1897 und Zeitschr. f. Geburtsh. u. Gynäk. Bd. XL.) — Zur Aetiologie der Tympania uteri. (Monatsschr. f. Geburtsh. u. Gynäk. 1898.)

2) Hitschmann, F. u. Lindenthal, Th. O., Ueber die Gangrène foudroyante. (Sitzungsber. d. kais. Akad. d. Wissensch. in Wien. Bd. CVIII. 1899.) — Ein weiterer Beitrag zur Pathologie und Aetiologie der Gangrène foudroyante. (Wien. klin. Wochenschr. 1900.) — Ueber die Schaumorgane und die bakteriellen Schleimhautemphyseme. (Sitzungsber. d. kais. Akad. d. Wissensch. in Wien. Bd. CX. 1901.)

3) Albrecht, P., Ueber Infektionen mit gasbildenden Bakterien. (Arch. f. klin. Chir. Bd. LXVII.)

zu Resultaten gelangten, welche nicht nur mit unseren bisherigen Kenntnissen über die Anaërobien im Widerspruche stehen, sondern auch geeignet sind, den derzeitigen Stand der Forschung über die Anaërobien zu verwirren.

Bevor mit der Publikation der früher erwähnten Untersuchungen über die Anaërobien begonnen wird, erscheint es aber zweckmäßig, zunächst eine ausführliche Darstellung der Technik zu geben, welche derzeit in unserem Institute geübt wird, was in folgender Mitteilung geschehen soll.

I. Ueber die anaërobe Züchtung.

Von Assistenten Dr. **Anton Ghon** und Dr. **Milan Sachs.**

Es giebt vier Wege, welche für die Züchtung der anaëroben Bakterien bisher eingeschlagen wurden. Der erste bezweckt den einfachen Ausschluß der Luft, der zweite die mechanische Entfernung der Luft, der dritte die Absorption des Luftsauerstoffes auf chemischem Wege und der vierte den Ersatz der Luft durch ein anderes indifferentes Gas. Diese Methoden wurden häufig untereinander kombiniert und für ihre Anwendung eine große Reihe von Apparaten konstruiert, von denen viele heute nicht mehr in Verwendung stehen.

Untereinander sind die erwähnten vier Prinzipien der anaëroben Züchtung jedoch nicht als gleichwertig zu betrachten, und ihre Benutzung wird unserer Meinung nach in erster Linie durch den Zweck bedingt sein, dem sie dienen sollen.

Handelt es sich darum, eine bereits gewonnene Reinkultur eines anaëroben Bakteriums weiterzuzüchten, so wird man zweifellos denjenigen Weg für die Züchtung einschlagen, der am einfachsten und schnellsten, aber gleichzeitig auch vollkommen sicher zum Ziele führt.

Obenan steht in dieser Beziehung unserer Meinung und Erfahrung nach die Methode der Ueberschichtung von Stichkulturen, welche auf der von W. und R. Hesse[1]) und namentlich von Liborius[2]) eingeführten Züchtung „in hoher Schicht" beruht.

Verwendet man bei dieser Methode Traubenzuckeragar als Nährboden, der wohl immer vorrätig ist, so ist man jederzeit in der Lage, rasch eine Ueberimpfung vorzunehmen. Zu berücksichtigen ist dabei nur, daß man den Nährboden jedesmal erst nach erfolgtem frischen Auskochen benutzt, ein Umstand, der aber gegenüber anderen Methoden keine Arbeitsvermehrung bedeutet und dem bei der anaëroben Bakterienzüchtung bekanntlich immer Rechnung getragen werden muß.

Die Ueberschichtung erfolgt am besten und einfachsten mit gewöhnlichem Agar. Will man ein übriges thun, so kann man dazu auch Zuckeragar benutzen.

Soll von einer derartigen Kultur weitergeimpft werden, so wirft man nach Sterilisierung des Eprouvettenrandes den zur Ueberschichtung

---

1) Hesse, W. u. R., Ueber Züchtung der Bacillen des malignen Oedems. (Dtsch. med. Wochenschr. 1885.)

2) Liborius, P., Beiträge zur Kenntnis des Sauerstoffbedürfnisses der Bakterien. (Zeitschr. f. Hyg. Bd. I. 1886.)

verwendeten Agarpfropfen mit einem ausgeglühten Platinspatel heraus und hat nun unbehinderten Zutritt zu dem Impfstiche, um davon mit einer am besten etwas längeren Platinöse fortzuimpfen.

Die überschichtete Zuckeragarkultur kann sowohl bei höherer als auch niederer Temperatur gehalten werden und ist auch für längeres Verweilen im Brütofen durch die Ueberschichtung vor dem Austrocknen geschützt. Bei voraussichtlich langer Beobachtung im Brütofen kann die Kultur noch überdies durch Gummikappen oder noch besser durch Guttaperchaverschluß geschützt werden.

Denselben Effekt wie durch die Ueberschichtung erreicht man allerdings auch dadurch, daß man hochgeschichtete Zuckeragarstichkulturen verwendet und nach der Impfung die oberflächliche Nährbodenschicht in der Höhe von ca. 1 cm verflüssigt und wieder erstarren läßt. Die Ueberschichtung erscheint uns jedoch empfehlenswerter, weil sie einfacher und handlicher ist und niemals ein Springen der Eprouvette zur Folge haben kann.

Die Verwendung anderer reduzierender Substanzen als Nährbodenzusatz, wie des ameisensauren und des indigoschwefelsauren Natrons, ist für den gewöhnlichen Bedarf völlig unnötig und hat nur dann einzutreten, wenn ein besonderer Zweck verfolgt werden soll.

Diese ausgezeichnete und dabei einfache Methode verwenden wir im Institute mit gutem Erfolge nicht nur beim Gebrauche der Agarnährböden, sondern wir haben das Prinzip dieser Ueberschichtungsmethode auch auf die Züchtung in Gelatine- und flüssigen Nährböden jeder Art übertragen. Auch in diesen im Folgenden näher beschriebenen Modifikationen bewährte sich uns die Methode in vortrefflicher Weise, sei es, daß es sich darum handelte, das Verhalten anaërober Bakterien in diesen Nährsubstraten zu prüfen, oder aber darum, geeignetes Impfmaterial für Tierversuche zu gewinnen.

Hat man es dabei mit Stichkulturen in Gelatinenährböden zu thun, so erfolgt die Ueberschichtung, die immer mit Agar, eventuell Zuckeragar zu geschehen hat, in der Weise, daß man nach der Impfung der vorher ausgekochten und dann erstarrten Gelatine dieselbe einfach mit dem flüssigen, auf ca. 45° C abgekühlten Agar übergießt. Will man Gelatineschüttelkulturen überschichten, so wird die Gelatine nach der Impfung in ein kaltes Wasserbad gestellt, dem zur Beschleunigung des Erstarrens eventuell einige Eisstückchen oder besser noch Ammoniumnitrat zugesetzt werden können, und unmittelbar nach der Erstarrung, die rasch erfolgt, mit Agar überschichtet. Der überschichtete Agar wird sofort fest, wenn man die Eprouvette in das Wasserbad zurückstellt. Bei beabsichtigter längerer Beobachtungsdauer ist es auch hier gut, die Kulturen durch einen geeigneten Verschluß vor dem Austrocknen zu schützen.

Diese Methode erweist sich als sehr brauchbar nicht nur für Gelatinekulturen, die man bei Zimmertemperatur, sondern auch für solche, die man zur Entwickelung bei Brüttemperatur (37° C) halten will. Die geimpfte Gelatine wird im Thermostaten flüssig und das Wachstum erfolgt dann in dem verflüssigten Nährboden, der durch die darüber befindliche Agarsäule vor Sauerstoffzutritt geschützt ist.

Zum Nachweise eventueller Bildung peptonisierender Fermente kann man solche Kulturen jederzeit in niedere Temperaturen bringen.

Auch die Gasbildung der gasentwickelnden anaëroben Bakterien

kommt in derartigen Gelatinekulturen in deutlichster Weise zum Ausdrucke.

Für die gewöhnliche Impfung wird man auch hier, wenn man nicht besondere Zwecke verfolgt, Traubenzucker (1—2 Proz.) als Zusatz zur Gelatine verwenden.

Derart angelegte Gelatinekulturen eignen sich besonders gut für Tierversuche, da man leicht größere Kulturmengen erhalten kann, wie sie gerade für Tierimpfungen mit anaëroben Bakterien oft erwünscht sind. Doch thut man gut, für diesen Zweck eine weniger konsistente Gelatine zu verwenden, welche man in sehr einfacher Weise dadurch herstellen kann, daß man Traubenzuckergelatine (10—12 Proz. Gelatine und 1—2 Proz. Traubenzucker) mit ungefähr derselben Menge Peptonwasser ad hoc vor dem Aufkochen verdünnt. Derartige Gelatine erstarrt noch gut, die Ueberschichtung gelingt also anstandslos und das Wachstum der verwendeten Bakterienkulturen erfolgt im Brütofen in ganz ausgezeichneter Weise. Wir bekamen in den ersten 24 bis 48 Stunden häufig ein diffuses Wachstum, bei Gasbildnern mit mehr oder weniger stürmischer Vergärung, nach dieser Zeit aber hat sich meist am Boden eine größere Menge der Bakterienkultur abgesetzt, die dann — nach Abgießen der darüber befindlichen Flüssigkeitsschicht — in dieser konzentrierten Masse angewendet werden konnte. Die Injektion dieser verdünnten Gelatine bereitet keinerlei Schwierigkeiten.

In gleich vorzüglicher Weise eignet sich die Ueberschichtungsmethode zur Anfertigung von Kulturen anaërober Bakterien in flüssigen Nährböden. Ihre Anwendung wird dadurch ermöglicht, daß man die flüssigen Nährböden nach der Beschickung in einem Kältegemische zum Gefrieren bringt und danach mit Agar überschichtet. Als Kältemischung verwendet man eine der gebräuchlichen, so Chlorcalcium mit Eis oder Ammoniumnitrat mit Wasser; man könnte die Gefrierung auch mittels flüssiger Kohlensäure bewerkstelligen. — Die dadurch bedingten niederen Temperaturen schädigen — soweit unsere jetzigen Erfahrungen reichen und wie wohl auch aus dem Verhalten anderer, sonst empfindlicher Bakterien geschlossen werden kann — die anaëroben Bakterien in keiner Weise. Die Erstarrung des verwendeten flüssigen Nährbodens erfolgt anstandslos, sei es, daß man Fleischbrühe oder Peptonwasser mit und ohne Zusatz von 1—2 Proz. Zucker, Glycerin, Stärke etc. oder Milch verwendet.

Die Methode, wie wir sie handhaben, ist folgende:

Die vorerst ausgekochten, auf ca. 40—45° C abgekühlten und nun geimpften Flüssigkeiten werden in die Kältemischung gebracht. In dieser gefrieren die flüssigen Nährböden für gewöhnlich rasch, worauf sie mit Agar bezw. Zuckeragar etwa 3 cm hoch überschichtet werden. Nachdem der Agar erstarrt ist, wird eine zweite Schicht flüssigen Agars, ungefähr von derselben Höhe, darauf gegossen und die Eprouvette sodann in das Wasserbad von 40—45° C gestellt, in welchem das vollständige Auftauen der gefrorenen Nährböden abgewartet wird. Ist dieses erfolgt, so werden die Eprouvetten in kaltes Wasser eingestellt und die obere Agarschicht erstarren gelassen.

Das zweizeitige Ueberschichten erachten wir deshalb als zweckmäßig, um eine Lockerung der überschichtenden Agarsäule durch den Volumswechsel der gefrorenen und wieder aufgetauten Flüssigkeit hintanzuhalten, welche das Eindringen von Luft zur Flüssigkeit und eventuell das Einsinken des Agars in den flüssigen Nährboden zur Folge haben könnte. Wenn es bei der eben angegebenen Vorgangsweise auch zu einer Lockerung des Agars kommt, so betrifft dieselbe nur die erste Agarschicht und die etwaigen dadurch entstandenen Spalten zwischen Eprouvettenwand und Agar werden durch den nachdringenden flüssigen Agar bei der zweiten Ueberschichtung ausgefüllt, wodurch wieder ein guter Abschluß bewirkt wird. Durch dieses Verfahren wird auch das Ein- und Untersinken des Agars in die Flüssigkeit verhindert, nur darf man keinen zu wasserreichen Agar zur Ueberschichtung verwenden.

Abgesehen von der Einfachheit dieser Züchtung in flüssigen Nährböden, zu welcher nur gewöhnliche Laboratoriumsutensilien gebraucht werden, zeichnet sich diese Methode auch durch ihre Sicherheit aus und ist der Ueberschichtungsmethode flüssiger Nährböden mit Oel bei weitem überlegen. Davon konnten wir uns durch vergleichende Untersuchungen und Versuche mit Methylenblauzusatz wiederholt überzeugen.

Handelt es sich jedoch um die Isolierung anaërober Bakterien aus einem Gemenge, so stehen uns dafür im wesentlichen zwei Wege offen. Entweder benutzt man auch für diesen Zweck die Kultivierung „in hoher Schicht“ oder man verwendet das Plattenverfahren.

Die Methode der Kultivierung „in hoher Schicht“ kann für die Isolierung in zweifacher Weise angewendet werden:

Unter gewissen Umständen verwendet man vorteilhaft die Kultivierung in hoher Zuckeragarschicht mit „Erhitzung“. Es wird dabei entweder das für die Untersuchung bestimmte Material oder noch besser die damit geimpften Zuckeragarröhrchen durch eine gewisse Zeit auf eine bestimmte Temperatur erhitzt.

Diese Methode wurde von verschiedener Seite in mehreren Variationen geübt, sie setzt jedoch voraus, daß man es mit anaëroben Bakterien zu thun hat, die gewisse höhere Temperaturen durch kürzere oder längere Zeit vertragen und bezweckt, eventuelle andere störende Keime, die durch diese Temperaturen vernichtet werden, auszuschalten. Damit sind die Grenzen der Anwendbarkeit dieser Methode gegeben. Immerhin bietet dieselbe zweifelsohne große Vorteile, man wird sie deshalb immer anwenden, wenn die erwähnten Bedingungen zutreffen und vor allem wenn es sich nur um eine Bakterienart handelt, die man isolieren will.

Von den verschiedenen Modifikationen dieser Methode [Kitasato[1]), Hitschmann und Lindenthal[2]), v. Hibler[3]) und E. Fraenkel[4])] erscheint uns die von Hitschmann und Lindenthal geübte, bei welcher die Kulturröhrchen nach der Impfung erhitzt werden, als die zweckmäßigste.

Sind jedoch in dem zu untersuchenden Materiale mehrere anaërobe Arten, die der Erhitzung widerstehen, oder neben anaëroben noch resistente aërobe Bakterien enthalten oder aber handelt es sich um nicht resistente Anaërobien, so wird die Erhitzungsmethode allein nicht zum Ziele führen.

In diesem Falle können wir — abgesehen vom Plattenverfahren — die zweite Züchtungsmethode „in hoher Schicht“ zur Isolierung benutzen, das ist die Züchtung in der „Schüttelkultur mit Verdünnungen“, welche namentlich Veillon und seine Schüler[5]) benützten, später auch

---

1) Kitasato, S., Ueber den Tetanusbacillus. (Zeitschr. f. Hyg. Bd. VII. 1889.)

2) Hitschmann u. Lindenthal, l. c.

3) v. Hibler, E., Zur Kenntnis der durch anaërobe Spaltpilze erzeugten Infektionserkrankungen etc. (Centralbl. f. Bakt. etc. Abt. I. Bd. XXV. 1899.)

4) Fraenkel, E., Ueber den Erreger der Gasphlegmonen. (Münch. med. Wochenschr. 1899.)

5) Veillon et Zuber, Recherches sur quelques microbes strictement anaërobies et leur rôle en pathologie. (Arch. de méd. expér. et d'anat. pathol. 1898. Juillet.) — — Tissier, H., Recherches sur la flore intestinale normale et pathol. du nourrisson. Paris 1900. — Rist, Neue Methoden und neue Ergebnisse im Gebiete der bakteriologischen Untersuchung gangränöser und fötider Eitermengen. (Centralbl. f. Bakt. etc. Abt. I. Bd. XXX. 1901.)

v. Hibler[1]) für Gelatine verwendete und in jüngster Zeit wieder Burri[2]) und A. Stolz[3]) warm empfahl.

Diese Methode ist auch unserer Erfahrung nach als eine höchst wertvolle anzusehen und bei den Arbeiten mit den anaëroben Bakterien dürfte sie kaum zu entbehren sein.

Die Anzahl der anzulegenden Verdünnungen richtet sich in erster Linie nach der vorhandenen Bakterienmenge und nach der Menge des zur Impfung verwendeten Materiales.

Die Vorteile, die diese Methode bietet, sind keine geringen und fallen bei der anaëroben Züchtung oft sehr in die Wagschale. Hervorzuheben wäre vor allem der Umstand, daß das zu verarbeitende Material die denkbar geringste Zeit mit der Luft in Berührung kommt. Für empfindliche anaërobe Arten ist dieser Umstand sicherlich nicht ohne Belang. Dadurch, daß die Methode völlige Anaërobiose ermöglicht, ist sie ferner als eine sichere anzusehen, gestattet beliebig lange Beobachtungszeit und die Möglichkeit, verschiedene Kolonieen zu verschiedenen Zeiten abzuimpfen. Dabei ist sie einfach und deshalb leicht und überall ausführbar.

Diesen nicht zu unterschätzenden Vorteilen stehen allerdings auch einige Nachteile gegenüber. So erscheint bei dieser Methode die unmittelbare mikroskopische Betrachtung der Kolonieen ausgeschlossen. Bei Anwesenheit von gasentwickelnden Mikroorganismen kann ferner — wie schon Veillon und Zuber hervorheben — der Agar zerrissen und durch den Druck der entstandenen Gase aus den einzelnen Agarstücken Flüssigkeit ausgepreßt werden, wodurch jede isolierte Abimpfung unmöglich wird. Diese kann auch dadurch erschwert oder sogar unmöglich werden, daß manche Bakterienarten in der Umgebung der Kolonieen eine mehr oder weniger dichte, weißliche Trübung verursachen.

Die beiden letzterwähnten Uebelstände werden nur in dichter besäten Kulturen störend hervortreten; man kann ihnen durch Herstellung einer größeren Anzahl von Verdünnungen vorbeugen. Dem ersterwähnten Nachteile kann man teilweise dadurch abhelfen, daß man nach dem Vorgange von Burri die Agarsäule in parallele Scheiben zerlegt und diese mikroskopiert.

Die Abimpfung der Kolonieen in den nach dieser Methode angelegten Kulturen kann in verschiedener Weise vorgenommen werden. Sie wird sich in erster Linie nach dem Resultate der Züchtung richten. Am zweckmäßigsten erscheint uns im allgemeinen das von Veillon angegebene Verfahren zu sein, welches darin besteht, daß man mit lang ausgezogenen Pipetten die gewählte Kolonie unter Vermeidung anderer Kolonieen „aussticht" und in eine andere Eprouvette mit Zuckeragar überträgt. Dadurch, daß nun die Originalkultur wieder in den Brütschrank zurückgestellt werden kann, um eventuell die Entwickelung anderer noch vorhandener Bakterienarten abzuwarten, trägt dieses Verfahren dem Umstande Rechnung, daß nicht alle Bakterienarten sich in derselben Zeit sichtbar entwickeln und daß manche der sich rasch entwickelnden Arten auch wieder früh absterben.

---

1) v. Hibler, l. c.

2) Burri, Zur Isolierung der Anaëroben. (Centralbl. f. Bakt. etc. Abt. II. Bd. VIII. 1902. No. 17.)

3) Stolz, A., Die Gasphlegmone des Menschen. (Beiträge z. klin. Chirurgie. Bd. XXXIII.)

Der Einwand, den bereits E. Fraenkel gegenüber E. v. Hibler erhebt, daß beim Ausstechen einer Kolonie aus der Tiefe des Zuckeragars aus den höheren Schichten des Nährbodens Keime einer anderen Bakterienart, die noch keine sichtbare Kolonie gebildet hat, mitgenommen werden könnten, daher die erhaltene Kultur dann keine reine wäre, muß allerdings gelten gelassen werden, doch kann ein derartiger Zufall unserer Meinung nach die Isolierung doch nur verzögern, nicht aber völlig verhindern.

Die andere Methode, die Methode des Plattenverfahrens, wurde bisher in verschiedener Weise ausgeführt, und dabei kamen vorwiegend die verschiedenen Prinzipien der anaëroben Züchtung zur Verwendung, die wir eingangs erwähnt haben, doch erwiesen sich nicht alle als gleich brauchbar.

Das Prinzip des einfachen Luftausschlusses kann auch hier angewendet werden, indem man das Verfahren der „hohen Schicht" mit Benützung von Traubenzuckeragar einfach auf die Platte überträgt (Liborius). Wir verfuhren dabei meist so, daß wir in gewöhnliche oder etwas höhere Petri-Schalen die geimpften Zuckeragarröhrchen ausgossen und sofort nach dem Erstarren oder besser noch, wenn der Zuckeragar gerade in Erstarrung überging, mit Agar oder Zuckeragar bis fast zum Rande der inneren Schale überschichteten. Thatsächlich gelingt es auch, in solchen Kulturen anaërobes Wachstum zu erzielen, nur erhält man ausschließlich Tiefenkolonieen. Diese Methode, die in unserem Institute vor längerer Zeit auch ab und zu gebraucht wurde, giebt nicht immer verläßliche Resultate und könnte daher nur ausnahmsweise als Notbehelf dienen.

Das Prinzip der Evakuierung, i. e. der mechanischen Entfernung der Luft, hat sich für das Plattenverfahren nicht als sehr brauchbar erwiesen und ist derzeit wohl ziemlich allgemein aufgegeben.

Das Prinzip der chemischen Absorption des Sauerstoffes (Methode Buchner[1]) wird zwar noch vielfach geübt und in neuester Zeit wieder von Hammerl[2]) befürwortet, wir können uns dafür jedoch nicht erwärmen. Abgesehen von den dabei verwendeten Apparaten mit ihren vielfach unsicheren Verschlüssen kommt bei dieser Methode vor allem der Umstand in Betracht, daß die Absorption des Sauerstoffes immerhin längere Zeit erfordert (ca. 24 Stunden und mehr), wenn sie überhaupt völlig erfolgt. Für resistentere anaërobe Bakterien wird dies in vielen Fällen wohl mehr oder weniger gleichgiltig sein, nicht aber für die empfindlichen nicht sporenbildenden Arten.

Uebrigens sei hier nachträglich bemerkt, daß auch für die Züchtung schon gewonnener Reinkulturen diese Methode (Buchner's Röhrchen) unserer Ansicht nach keinerlei Vorteile bringt und namentlich der Ueberschichtungsmethode, wie wir sie oben geschildert haben, entschieden nachsteht.

Bessere Resultate giebt unstreitig das Prinzip des Ersatzes des Luftsauerstoffes durch ein anderes indifferentes Gas. Als solches wird allgemein das Wasserstoffgas empfohlen und auch angewendet. Zu einer besonders brauchbaren wurde diese Methode von Botkin[3]) gemacht

---

1) Buchner, Eine neue Methode zur Kultur anaërober Mikroorganismen. (Centralbl. f. Bakt. etc. Bd. IV. 1888.)

2) Hammerl, Ein Beitrag zur Züchtung der Anaëroben. (Centralbl. f. Bakt. etc. 1901 u. 1902.)

3) Botkin, Eine einfache Methode zur Isolierung von anaëroben Bakterien. (Zeitschr. f. Hyg. Bd. IX. 1890.)

indem er sie mit der Methode kombinierte, die das Prinzip der chemischen Absorption verfolgt. Eine völlig exakte wurde sie aber erst durch Schattenfroh und Grassberger[1]), welche die Methode in der vorteilhaftesten Weise umänderten und einen besonderen Fortschritt in der anaëroben Plattenzüchtung durch die von ihnen modifizierte Anwendung der Botkin'schen Glocke erzielten. Nur erwies sich das Verfahren, wie die Autoren selbst hervorheben, als ein etwas kostspieliges.

P. Albrecht[2]) empfand dasselbe bei seinen im Institute ausgeführten Arbeiten aber auch vielfach als umständlich, weshalb er die von Schattenfroh und Grassberger angegebene Methode dahin abänderte, daß er absolute Sauerstofffreiheit des im Kipp'schen Apparate erzeugten Wasserstoffgases durch Einschaltung eines Verbrennungsofens mit einer Kupferspirale erzielte. Dadurch wurde gleichzeitig eine Verminderung der Zahl der eingeschalteten Flaschen auf 2 ermöglicht. Von diesen sollte die eine mit einer Lösung von hypermangansaurem Kali in 15-proz. Schwefelsäure hauptsächlich als „Gluckflasche" dienen, während das andere mit Aetzkali gefüllte Gefäß dazu bestimmt war, etwaige sauere Verunreinigungen des Wasserstoffes zurückzuhalten. Thatsächlich konnte P. Albrecht der Methode von Schattenfroh und Grassberger durch diese Umänderung eine bedeutende Vereinfachung geben und außerdem eine sichere Gewähr dafür, daß der Wasserstoff vollständig sauerstofffrei zur Verwendung gelangte.

Der Uebelstand, welcher unserer Meinung der Methode auch jetzt immer anhaftete, bestand teils in der zeitraubenden Bedienung des Kipp'schen Apparates und der Einschaltung der beiden Flaschen, teils darin, daß bei stärkerer Inanspruchnahme des Apparates der Wasserstrom, welcher nach der Forderung von Schattenfroh und Grassberger „in raschem Tempo" durchgeleitet werden soll, kein konstanter bleibt, sondern verhältnismäßig schnell an Stärke abnimmt. Die Ueberwachung des Apparates während der Züchtung mußte deshalb auch bei der von P. Albrecht angegebenen Anwendungsweise eine sehr sorgfältige bleiben.

Es war daher als nächstes Ziel der Verbesserung dieses sonst so exakten Verfahrens anzustreben, durch Verwendung chemisch reinen Wasserstoffgases die Beseitigung des Kipp'schen Apparates und der eingeschalteten Waschflaschen zu ermöglichen und dadurch die Methode noch weiter ohne Einbuße ihrer Exaktheit zu vereinfachen.

Wir glauben dieses Ziel in der Verwendung elektrolytisch gewonnenen Wasserstoffgases gefunden zu haben, wie es käuflich in Ballons überall und sehr billig zu erhalten ist. Dem so gewonnenen Wasserstoffe, der chemisch rein ist, haftet als einzige Fehlerquelle noch die Anwesenheit geringer Sauerstoffmengen an[3]). Diese geringen Mengen von Sauerstoff dachten wir am einfachsten und sichersten durch Verwendung der glühenden Kupferspirale (P. Albrecht) beseitigen zu können.

---

1) Schattenfroh und Grassberger, Ueber Buttersäuregärung. I. Abhandlung. (Arch. f. Hyg. Bd. XXXVII.)
2) Albrecht, P., l. c.
3) Man erhält zwar angeblich auch völlig sauerstofffreien Wasserstoff. Dadurch würde sich aber der Kostenpunkt bei der Züchtung etwas erhöhen und eine absolute Gewähr wäre immer noch nicht gegeben, so daß die Verwendung dieses angeblich sauerstofffreien H keinen Vorteil brächte.

Auf diese Weise wurde die Anzahl der Bestandteile, die den zur Züchtung nötigen Apparat zusammensetzen, auf 2 reduziert: den Wasserstoff liefernden Ballon und die Verbrennungsröhre. Jede Einschaltung von Flaschen und Glasröhren erscheint damit unnötig und die Vorbereitung, Bedienung, sowie die Ingangsetzung des ganzen Apparates ist in ganz außerordentlicher Weise vereinfacht.

Der in verdichtetem Zustande in den Ballons enthaltene Wasserstoff steht unter dem hohen Drucke von ca. 140 Atmosphären. Durch Verwendung eines Reduktionsventiles kann der Druck ein für allemal auf eine bestimmte Höhe eingestellt werden. Wir benützen bei unseren Arbeiten einen Druck von ca. 0,25 Atmosphären. Von dem Auslauf des Reduktionsventiles führt ein von einem Glashahne unterbrochener Gummischlauch zum Verbrennungsofen und von diesem ein zweiter Schlauch direkt unter die Botkin'sche Glocke.

Der Vorgang, den wir mit dieser Vorrichtung bei der Züchtung in Wasserstoffatmosphäre einschlagen und der sich direkt an die von Schattenfroh und Grassberger und dann von P. Albrecht geübte Methode anschließt, sei in Folgendem ausführlicher angegeben:

Zunächst wird der Schraubenhahn, der den Wasserstoffballon mit dem Reduktionsventile verbindet, aufgedreht. Das entsprechende Manometer des Reduktionsventiles zeigt nun die Atmosphärenzahl des im Ballon herrschenden Druckes an. Aus dieser Zahl kann man jederzeit die Menge des noch vorrätigen Wasserstoffes durch Multiplikation mit dem Rauminhalte des Ballons, der immer angegeben ist, leicht berechnen. Dann wird der Schraubenhahn, welcher das Reduktionsventil mit dem zum Verbrennungsofen führenden Gummischlauche verbindet, aufgedreht und gleichzeitig der in diesen Schlauch eingeschaltete Glashahn geöffnet. Der Wasserstoff strömt nunmehr bei dem freien Ende des vom Verbrennungsofen abführenden zweiten Schlauches aus. Durch Eintauchen des freien Schlauchendes oder noch besser durch Eintauchen eines ad hoc angesetzten Glasrohres kann Stärke und Geschwindigkeit des ausströmenden Wasserstoffes kontrolliert werden. Der Atmosphärendruck des ausströmenden Wasserstoffes ist am zweiten Manometer des Reduktionsventiles ersichtlich.

Durch den erwähnten Schraubenhahn des Reduktionsventiles wird jetzt die Stromstärke des Wasserstoffes auf jenes Maß eingestellt, welches man als Maximum während der Züchtung zu benützen gedenkt.

Ist dies geschehen, so wird nunmehr an dem Wasserstoffballon und dem Reduktionsventil nicht mehr gerührt. Der Wasserstoffstrom wird nur einige Sekunden in der eingestellten vollen Stärke ausströmen gelassen, dann aber durch den Glashahn, welcher in den zum Verbrennungsofen führenden Gummischlauch eingeschaltet ist, so reguliert, daß nur einzelne Gasbläschen im Wasser aufsteigen.

Nachdem 5—10 Minuten der Wasserstoff in dieser minimalen Stärke durchgeleitet wurde, wird zunächst eine, bald darauf eine zweite und dritte Flamme des Verbrennungsofens angezündet und sodann das für die Züchtung bestimmte Material sowie die Zuckeragarplatten vorbereitet.

In kurzer Zeit beginnt die Kupferspirale zu glühen, worauf zur Anlegung der Kulturen geschritten wird. Das Plattenstreichen bezw. das Plattengießen soll möglichst kurze Zeit beanspruchen. Die beschickten Platten werden rasch nacheinander auf den Ständer der Botkin'schen Glocke gestellt und der Verschluß dieser nach Schattenfroh und Grassberger mit Pyrogallollösung und Paraffinöl besorgt.

Durch entsprechende Regulierung an dem in den ersten Gummischlauch eingeschalteten Glashahne erzielt man sodann die Stärke und Raschheit des Wasserstoffstromes, welche für die Züchtung gewünscht wird.

Es gelangt also der Wasserstoff aus dem Ballon über die glühende Kupferspirale unter die Botkin'sche Glocke, in welcher er durch den zweiten Gummischlauch bis unmittelbar unter die Kuppe der Glocke geleitet wird. Die Ableitung der Luft aus der Glocke bezw. des Wasserstoffes geschieht gleichfalls durch einen Gummischlauch, der in der Glocke jedoch nur wenig über das Niveau der Pyrogallollösung reicht und an dessen freiem äußeren Ende ein Glashahn angebracht ist. Die Führung beider Schläuche in der Glocke wird durch Metallringe bewerkstelligt, die an dem Plattenständer in entsprechenden Entfernungen angebracht sind.

Die Dauer, welche notwendig ist, den Wasserstoffstrom durch die Botkin'sche Glocke zu leiten, hängt hauptsächlich von der verwendeten Stromstärke ab. Im all-

gemeinen genügen für eine Glocke mit 10 Platten etwa 10—15 Minuten vollauf. Während dieser Zeit kann man den Apparat ruhig sich selbst überlassen, der Wasserstoff durchströmt denselben gleichmäßig in der eingestellten Stärke. Will man die Geschwindigkeit des Stromes von Zeit zu Zeit kontrollieren, so taucht man einfach den aus der Glocke abführenden Schlauch in Wasser.

Soll die Durchleitung des Wasserstoffstromes beendet werden, so löscht man zunächst die Flammen des Verbrennungsofens ab und schließt unmittelbar darauf gleichzeitig den Hahn des aus der Glocke führenden Gummischlauches und den Glashahn, der in dem zum Verbrennungsofen führenden Schlauche eingeschaltet ist. Sodann werden die beiden Schläuche aus der Botkin'schen Glocke herausgezogen, die Pyrogallollösung nach dem Vorgange von Schattenfroh und Grassberger alkalisch gemacht und schließlich die Schraubenhähne des Wasserstoffballons und des Reduktionsventiles zugedreht. Damit ist die Züchtung beendet.

Es ist unter Umständen, die sich beim Arbeiten mit diesem Apparate von selbst ergeben, vorteilhaft, auch in den vom Verbrennungsofen zur Glocke führenden Schlauch einen Glashahn einzuschalten, um nach Beendigung der Züchtung die Zuleitung des Wasserstoffstromes zur Glocke abzustellen.

Die Methode, welche wir eben genauer besprochen haben, kann mit Vorteil sowohl für gegossene als auch gestrichene Platten verwendet werden. Namentlich wertvoll ist das Plattenstrichverfahren, weil die Verwendung der Oberflächenkulturen für die Unterscheidung der Bakterienarten außerordentlich wichtig ist und unserer Erfahrung nach auch bei den anaëroben Bakterien, ähnlich wie bei den aëroben, das Aussehen der Oberflächenkolonieen ein wichtiges und konstantes Merkmal bildet, welches nur innerhalb gewisser Grenzen schwankt.

Durch dieses Verfahren haben wir es völlig in der Hand, tadellose Platten zu erhalten, und zwar auch von solchen anaëroben Bakterien, die beweglich sind. Es ist dabei nur erforderlich, genau auf den Feuchtigkeitsgrad der Nährbodenoberfläche zu achten und namentlich bei beweglichen Arten nur völlig trockene Oberfläche zu benützen. Dies ist jederzeit leicht zu erreichen. Dadurch wird es uns dann möglich, einerseits die Charaktere der Oberflächenkolonieen von Reinkulturen anaërober Arten genau zu studieren, andererseits selbst verschiedene Anaërobien aus einem Bakteriengemenge in einfacher und bequemer Weise zu isolieren.

Wegen der Einfachheit und relativ leichten Ausführbarkeit hat sich die geschilderte Methode aber auch dafür bewährt, unter der Glocke Reinkulturen in flüssigen Nährböden zu züchten. Ein entsprechend geformter Metallständer für die Aufnahme einer größeren Reihe von Eprouvetten wird zu diesem Zwecke an Stelle des sonst für die Schalen verwendeten gesetzt. Dabei ist nur darauf zu achten, daß die Eprouvetten mit dem flüssigen Medium hochgefüllt sind, d. h. die Flüssigkeitsschicht soll bis fast an den Rand der Eprouvette reichen, ca. $^1/_2$ cm davon entfernt. Man erhält so sichere Kulturen, vorausgesetzt, daß die betreffenden Bakterien in den zur Verwendung gelangenden Flüssigkeiten überhaupt zur Entwickelung gelangen.

Verbesserungsfähig wäre nach unserer Meinung bei dieser Methode nur noch die Form der Botkin'schen Glocke. Die Größe der derzeit im Institute verwendeten Glocken (für 10 Schalen) bedingt es, daß man sich nur bei den obersten 2—3 Platten von einem eventuellen Wachstum durch direkte Besichtigung — ohne die Glocke zu öffnen — überzeugen kann. Die Verwendung verschieden großer Glocken wäre zum Teil geeignet, diesem geringfügigen Uebelstande abzuhelfen, abgesehen davon, daß dadurch auch an Wasserstoff gespart werden könnte. Denn es wird ja zweifelsohne nicht immer nötig sein, Züchtungen mit 8—10 Platten zu veranstalten. Durch Verwendung mehrerer klei-

nerer Glocken an Stelle einer großen wäre es auch ermöglicht, von Platten, die mit demselben Materiale beschickt wurden, nach verschiedenen Zeiten abzuimpfen. Auf die Notwendigkeit dieses Umstandes haben wir schon früher bei der Besprechung der Isolierung mit Kulturen „in hoher Schicht" hingewiesen. Besser aber noch wäre es, die derzeit in Verwendung stehende Glockenform durch ein flaches Modell mit demselben flüssigen Verschlusse zu ersetzen, welches die Möglichkeit böte, eine gewisse Anzahl von Platten nicht übereinander, sondern nebeneinander aufstellen zu können[1]).

Die Frage, die sich nunmehr aufdrängt, ob der Verdünnungsmethode in Eprouvetten oder aber der Plattenmethode in der Wasserstoffatmosphäre — das Erhitzungsverfahren in hoher Schicht kommt ja nur in ganz bestimmten Fällen in Betracht — für die Isolierung der anaëroben Bakterien der Vorzug zu geben sei, ist nicht ohne weiteres zu beantworten.

Die Isolierung durch die Plattenmethode bietet zweifelsohne zahlreiche große Vorteile, so daß ihre Anwendung im allgemeinen in ausgedehntem Maße empfohlen zu werden verdient.

Bei unseren Arbeiten mußten wir jedoch die Erfahrung machen, daß in einigen Fällen durch die Verdünnungsmethode in der Eprouvette anaërobe Arten zum Wachstum gelangten, die auf den gleichzeitig angefertigten Platten nicht angegangen waren — trotz tadellosen Funktionierens der Züchtungsmethode. Es handelte sich dabei um besonders empfindliche, zugleich auch sehr langsam wachsende Arten, über welche wir in unseren späteren Mitteilungen berichten werden.

Die Erklärung für diese Thatsache ist leicht einzusehen: Vor allem sind bei der Plattenmethode in Wasserstoffatmosphäre die Bakterienkeime doch eine gewisse Zeit der Luft ausgesetzt, wenn diese Zeit durch rasches Arbeiten auch auf ein Minimum reduziert werden kann. Aber den Einfluß der Luft auf die verschiedenen anaëroben Formen kennen wir noch nicht. Wenn derselbe allein auch für die kurze Zeit vielleicht kein allzu schwer schädigender sein muß, so wird er im Vereine mit dem Umstande, daß die Bakterien durch die Züchtung in andere Lebensbedingungen gesetzt werden, doch nicht als gleichgiltig angesehen werden können. Sodann erfolgt auch bei den anaëroben Bakterienarten nach unseren Beobachtungen die Entwickelung nicht bei allen in der gleichen Zeit. Es giebt Arten, die dazu länger brauchen als andere. Oeffnet man die Botkin'sche Glocke früher, weil man das Zugrundegehen bereits zur Entwickelung gelangter Keime fürchtet, und stehen einem keine anderen Platten von demselben Materiale zur Verfügung, so müssen solche langsam wachsende Arten der Isolierung entgehen. Derselbe Mißerfolg könnte eintreten, wenn der Abschluß der Glocke aus irgend einem Grunde früher undicht wird oder wenn es sich um Keime handelte, die besonders lange Zeit zum Wachstume brauchten.

Es folgt aus dem Angeführten, daß die Plattenmethode nicht für alle Zwecke ausreichen wird. Da aber auch die Verdünnungsmethode in Eprouvetten Nachteile zeigt, die wir bereits früher besprochen haben,

---

1) Die Firma Rohrbeck's Nachfolger in Wien I, Kärntnerstraße 59, ist derzeit daran, ein Modell in diesem Sinne nach unseren Angaben auszuarbeiten. Sollte es sich als brauchbar erweisen, so werden wir darauf ohnedies in unseren späteren Mitteilungen zurückkommen.

und unter Umständen — so bei ungünstiger Verdünnung und ungleichmäßiger Verteilung — eine Isolierung sämtlicher Keime in Frage stellen kann, erscheint es unserer Meinung nach geboten, bei Untersuchungen, bei denen man mit noch unbekannten Faktoren zu rechnen hat, nicht ausschließlich die eine oder die andere der Methoden zu pflegen, sondern beide je nach den gegebenen Umständen in wechselnder Kombination zu verwerten. Häufig ist es gut, auch noch die Erhitzungsmethode den beiden anderen anzuschließen.

Aber auch bei der Verwendung aller dieser Verfahren wird man unserer Meinung nach nicht unter allen Umständen zum Ziele gelangen müssen. Unsere Kenntnisse über die anaëroben Bakterien sind, wie eingangs erwähnt, noch lückenhafte und vieles in der Biologie derselben ist uns noch völlig unbekannt. Außerdem wissen wir von den aëroben Bakterienarten her, daß nicht immer alles angeht, was ausgesäet wird und daß wir dafür nicht immer eine befriedigende Erklärung geben können, wenn auch zweifellos die durch die Kultivierung gesetzte Aenderung der Lebensverhältnisse eine Hauptrolle spielt, insonderheit dann, wenn nur wenige Keime einer bestimmten Art im Aussaatmateriale vorhanden sind.

Man wird daher gut thun, diese Gesichtspunkte auch bei der anaëroben Züchtung zu berücksichtigen.

Ist die Schlafkrankheit der Neger eine Intoxikations- oder Infektionskrankheit?

Von Dr. **Hans Ziemann,** Marinestabsarzt S. M. S. „Moltke".

Mit 1 Fig. im Text.

Ein Fall von Schlafkrankheit der Neger ist meines Wissens in einer deutschen Kolonie noch nicht beschrieben worden. F. Plehn giebt an, in Westafrika einmal von 2 Fällen durch seine schwarzen Gewährsmänner gehört zu haben, die nach kurzer Zeit einen tödlichen Ausgang nahmen. Er läßt sich darüber nicht aus, welchem Stamme die betreffenden 2 Neger angehört haben. Die Schlafkrankheit der Neger (Negro lethargy, Congo sickness, Sleeping sickness of West Africa, Maladie du sommeil, doenca de somno, Not ansi und andere Synonyma) kommt bekanntlich vom Senegal herunter bis nach Angola vor und äußert sich in einer Schläfrigkeit, die zuletzt in völlige Schlafsucht übergeht, und unter meist eintretendem Sopor durch Inanition in mehreren Monaten, seltener erst nach Jahren zum Tode führt. Auf die klinischen Erscheinungen werden wir noch zurückkommen. In Westindien und British Guyana soll die Krankheit auch bei Negern vorkommen, die aus West-Afrika eingeführt sind, in Guyana nach Ferguson auch bei eingeborenen Indianern. Ich habe mir große Mühe gegeben, in Trinidad, wo ich über 3 Wochen war, ferner in Jamaica, St. Thomas und auch in Venezuela Fälle ausfindig zu machen, indes ohne den geringsten Erfolg. Jedenfalls scheint mir in dem Küstenstriche Venezuelas, wo ich fast jeden Küstenplatz kennen lernte, die Krankheit, wenn überhaupt, sehr selten vorzukommen. Es ist das deswegen bemerkenswert, da Ferguson in dem benachbarten Guyana die Krankheit auf Infektion durch *Anky-*

lostomum zurückführt, und ich in dem Küstenstriche Venezuelas Ankylostomiasis als scheinbar recht häufig vorkommend feststellen konnte.

Bekannt ist in Afrika, daß die Krankheit nur in bestimmten Distrikten auftritt, während sie in benachbarten oft gar nicht bemerkt wird, daß sie ferner oft explosionsartig auftritt. In Kamerun habe ich die Krankheit bei den eingeborenen Duala niemals zu sehen bekommen, so sehr ich auch danach forschte. Sie scheint bei den Duala überhaupt nicht vorzukommen. Aeußerst charakteristisch ist, daß sichere Fälle von Erkrankung bei Weißen noch nicht beobachtet zu sein scheinen, ferner daß Kinder unter 3 Jahren nie oder äußerst selten erkranken. Auch das werde ich unten beleuchten. Während meiner regierungsärztlichen Thätigkeit in Kamerun 1899/1900 hörte ich, daß die Krankheit, die bekanntermaßen am Congo ja schon länger wütet, auch im nördlichen Angola ganz außerordentliche Verheerungen anrichtete. Dort sollen ganze Dörfer deswegen aussterben. Ich bat daher den nach Loanda gehenden damaligen Konsul und jetzigen Legationsrat Dr. Gleim, darauf sein Augenmerk zu richten, und teilte ihm die Gesichtspunkte mit, die mir in ätiologischer Beziehung in Frage zu kommen schienen. Legat.-Rat Gleim hatte auch die Liebenswürdigkeit, mir seine ersten Wahrnehmungen schriftlich mitzuteilen Derselbe berichtete dann über die Krankheit in außerordentlich interessanter Weise im Arch. f. Schiffs- und Tropenhygiene 1900. Ich selbst hatte die Absicht, nach Beendigung meiner regierungsärztlichen Thätigkeit in Kamerun, Mai 1900, nach dem Kongo zu gehen und später nach Nord-Angola, um die Krankheit zu studieren, hatte auch schon Empfehlungen der Regierung an die dortigen Behörden, als der betreffende Dampfer mich nicht aus äußeren Gründen aus Victoria nach dem Congo abholen konnte. Statt dessen wurden nun in Victoria und Togo in Ober-Guinea die Beziehungen der Mosquitos zur Malaria festgestellt[1]).

Vorher schon gelang es, einen interessanten Fall von Schlafkrankheit zu beobachten, der zu einigen Experimenten Anlaß gab. Gelegentlich einer medizinischen Inspektionsreise von Kamerun nach Viktoria, am Fuße des Kamerungebirges, traf ich in Viktoria den Neger Jamba am 10. Februar 1901 an der Schlafkrankheit leidend an. Derselbe ist ein Polizeisoldat, ein Wey-Neger aus Oberguinea, welcher seit 3 Monaten an der Krankheit leiden will; dieselbe hätte mit immer zunehmender Schläfrigkeit und Kopfschmerzen begonnen. In Victoria seit 1 Jahre, dort, was nicht unwichtig ist, mit mehreren Landsleuten einen Haushalt führend. Die Betreffenden bekommen außer der Löhnung von der Regierung wöchentlich eine Ration Zwieback und Salzschweinefleisch, seltener Fisch. Für Gemüse etc. sorgen sie selbst. Ich bemerke gleich, daß die Landsleute der einzelnen Negerstämme in der Fremde meist sehr zusammenhalten, auch zusammen kochen. Vorher war er angeblich in Batanga, südlich von Kamerun, bereits 2 Jahre gewesen. In seinem Geburtslande als Erwachsener angeblich zeitweise leichtes Fieber. In Batanga angeblich immer gesund, auch früher angeblich nie geschlechtskrank. An Heimweh angeblich nie gelitten, auch nie an übergroßer Arbeitslust, in der Beziehung also ein Normalneger. Nicht mehr Alkoholexcesse etc. wie jeder andere Neger. Die erwähnten Momente

1) Ziemann, H., Ueber die Beziehungen der Mosquitos zu den Malariaparasiten in Kamerun. (D. med. Wochenschr. 1900. No. 25.) — 2. Bericht über Malaria und Mosquitos an der afrikan. Westküste. [Vortr. auf intern. Kongreß zu Paris.] (D. med. Wochenschr. 1900.)

als Aetiologie in der Litteratur angeführt. Seit längerer Zeit kein geschlechtlicher Verkehr mehr, da „er immer bald einschlafe“. Errektionen ebenfalls schon lange nicht mehr. Zeitangaben eines Negers über persönliche Erlebnisse sind bekanntlich stets sehr unsicher, wenn sie nicht durch Angaben Anderer gestützt werden. — Verständigung erfolgt durch Dolmetscher. — In Victoria bekam er die als Cro-Cro von den Landsleuten bezeichnete Hautkrankheit, an der übrigens viele, sonst ganz gesunde Neger leiden. Jamba giebt an, in der Heimat viel Reis gegessen zu haben, in Batanga auch viel Maniok oder Kassada. Durch Dolmetscher erfährt man, daß auch im Wey-Lande in Oberguinea viel Maniok, dort aber auch öfter roh, gegessen wird, in Batanga wäre er ihres Wissens immer gekocht worden. Jamba wird zur weiteren Beobachtung mit nach Kamerun genommen, um dort im Hospital für Schwarze weiter beobachtet zu werden.

Status: Sehr kräftig gebauter, stumpfsinnig und schläfrig aussehender, etwa 20—25 Jahre alter Wey-Neger von gutem Ernährungszustande, der die Antworten widerwillig und knapp zwischen den Zähnen hervormurmelt. Derselbe sucht ständig nach einem Halt, wenn er steht, und tritt ohne denselben Schwanken ein. Der Gang ist ohne Unterstützung ein taumelnder, schwankender. Jedoch kann er noch ohne Unterstützung gehen, sucht aber nach etwa 15—20 Schritten sich längs der Wände bezw. der Bettstellen hinzutasten.

Die Conjunctiven sind leicht injiziert, der Blick leer und ausdruckslos. Die Haut zeigt das den Weys oft eigentümliche Gelbbraun, im Gegensatz zum Braunschwarz der anderen Bantus, aber sonst keine Pigmentanomalieen und Atrophieen, wie z. B. an dem Dorsum manus der Pellagrösen. An der Haut der Oberschenkel, an Brust und Bauch, besonders aber an der Innenseite der Oberschenkel ein leichter Grad von Cro-Cro, der ziemlich starkes Jucken verursacht. Dieser Ausschlag soll aber schon bestanden haben, ehe das jetzige Jucken so stark wurde. Es handelt sich um eine Dermatisis nodosa, welche in Kamerun, insbesondere unter den Busch- und Kru-Negern, die von Oberguinea kommen, sehr verbreitet ist, die ich aber nie bei Europäern gesehen. Durch das Zusammenrücken der kleinen stecknadelkopf- bis hirsekorngroßen Knötchen war es, wie in solchen Fällen häufig, auch bei Jamba zu einigen beetartigen, flachen, harten, höckerigen Auflagerungen gekommen, an deren Peripherie kleine, einzelne, junge Knötchen zu bemerken waren. Im Gegensatz zu F. Plehn war es mir nicht gelungen, in 2 anderen Fällen von Dermatitis durch Auftragen von abgeschabtem Material von solchen Auflagerungen auf die scarifizierte Haut anderer Neger die Krankheit zu übertragen. Am linken Oberarm bei Jamba einige Impfnarben. Haut sehr trocken, sonst keine Exantheme oder Oedeme. Nur die Inguinaldrüsen beiderseits zum Teil taubeneigroß, ziemlich weich geschwollen, nicht druckempfindlich. Nackenhinterhaupt und Supraclaviculardrüsen nicht geschwollen. Temperatur 36° C.

Puls 60, regelmäßig, mittelkräftig an der geradlinig verlaufenden, mäßig gespannten Radialis. Athmung 24 in der Minute regelmäßig, etwas oberflächlich, costo-abdominal.

Spezielles. Jamba ist zweifellos etwas benommen, läßt sich nur durch energisches Fixieren wachhalten für einige Minuten, um dann später die Seitelage einzunehmen, sich in seine Decke zu hüllen und einzuschlafen. Im übrigen sind Abnormitäten in der Gliederhaltung nicht festzustellen, auch keine Atrophieen und Lähmungen, speziell auch

nicht der Levatores palpebrae superioris. Bewegungen der Bulbi und des Mundes geschehen ganz regelrecht, auch die Bewegungen des Kopfes und der Glieder, sowohl aktiv wie passiv, wenn er die Rückenlage einnimmt. Keine Nackensteifigkeit. Stehend verfällt er bald immer wieder in Schwanken. Romberg'sches Symptom stark. Beim Ergreifen von Gegenständen und geschlossenen Augen leichte Unsicherheit. Eigentliche Sprachstörung nicht vorhanden. Schrift, da vollständig Analphabet, nicht zu prüfen. Klagen über Kopfschmerzen, die des Abends zuweilen stärker werden, ferner Schwindel. Der Schlaf tief und traumlos, auch am Tage. Jamba ist wie alle Neger schwer zu wecken. Tremor und tonisch klonische Krämpfe, welche bei Schlafkranken öfter beobachtet werden, nicht vorhanden, auch keine Wahnideeen und Hallucinationen. Im Gegenteil Dementia und Depressionsstadium. Sensibilität am ganzen Körper herabgesetzt (im Anfangsstadium oft noch nicht herabgesetzt). Feinste Berührungen werden gar nicht empfunden. Schmerzempfindung bei Nadelstichen nicht verlangsamt. Temperatursinn scheinbar herabgesetzt. Prüfung des Ortssinns und Muskelsinns geben bei der mangelnden Intelligenz keine sicheren Resultate. Gesicht, Gehör, Geruch, Geschmack scheinbar nicht herabgesetzt, jedenfalls nicht wesentlich. Augenhintergrund bei Untersuchung mit dem Augenspiegel völlig normal. Patellarreflex vollkommen erloschen. Bauchreflex nicht vorhanden, auch nicht Achillessehnen- und Tricepsreflex, Cornea- ebenso der Nasenschleimhautreflex erhalten. Die gleich weiten mittelgroßen Pupillen reagieren schwach auf Licht und Konvergenz. Die elektrische Erregbarkeit bei Prüfung mit dem faradischen Strom herabgesetzt, ebenso die grobe motorische Kraft.

Lippen und Zunge etwas trocken, Zunge leicht belegt, wird gerade, aber etwas zitternd vorgestreckt, kein übelriechender Speichel, wie er sonst wohl beschrieben wird. Appetit gut, Durst normal. J. erhielt anfangs die gewöhnliche Nahrung der anderen Kranken, die meist aus Reis, Hartbrot und Salzfleisch bezw. Fisch besteht und Früchten, wie Bananen. Erbrechen nicht vorhanden. Stuhlgang weich-breiig, gelb, enthält Eier von *Ascaris lumbricoides*, kein *Ankylostoma duodenale*, ohne besonderen Gestank[1]). Abdomen ohne Besonderheiten, keine Druckempfindlichkeit, die sonst schon beobachtet ist. Leber und Milz nicht vergrößert.

Atmung erfolgt gleichmäßig. Ueber den Lungen nichts Abnormes, ebenso nicht über dem Herzen und den großen Gefäßen.

Zahl der roten Blutkörperchen in 1 cbmm 4 321 570
„ „ weißen „ „ 1 „ 23 500.

Es besteht also etwas Hyperleukocytose. Die eosinophilen Zellen sind doppelt so viel wie normal. Aeußerst selten ist basophile feine Tüpfelung der roten Blutzellen. Im übrigen erscheinen die roten Blutzellen in Größe etc. normal. Keine Malariaparasiten.

Hämoglobingehalt mit dem Fleischl-Apparat 58.

Im Blute Embryonen von *Filaria perstans*. Es kommt 1 *Filaria*-Embryo auf etwa 10—12 Gesichtsfelder. Bei bakteriologischer Untersuchung des Blutes, steril der Vena cephalica entnommen, zeigt sich dasselbe bei Untersuchung auf Gelatine und Agar-Agar völlig steril. Urinentleerung erfolgt willkürlich, ohne Schmerzen. Menge in 24 Stunden

---

1) Mense beschreibt im Arch. f. Schiffs- und Tropenhygiene. 1900. p. 364 in einem sehr interessanten Aufsatze über Schlafkrankheit sauere, fischartig riechende Schleimmassen im Stuhl eines Kranken.

2700. Spezifisches Gewicht 1009. Urin gelblich, klar, ohne Albumen und Sacchaum oder sonstige Formbestandteile.

J. wird zunächst abwartend behandelt, die Dermatitis ohne Erfolg mit Lysol, Ichthyol und Chrysarobin. Am 13. Febr. Santonin-Kur,



3 Tage hindurch mit Ol. Ricini. Am 18. Febr. Ascariden verschwunden. Der körperliche Befund bleibt derselbe. Niemals Temperatursteigerung über 37°. Temperatur schwankte meist zwischen 36 und 36,3°. Die Embryonen der *Filaria perstans* bei Tag und Nacht bei wiederholten Untersuchungen unverändert. Methylenblau tgl. à 1,0 in Kapseln, 10 Tage lang, blieben ohne Einfluß auf die Filarien.

Wiederholte Untersuchung des Blutes zeigt dasselbe stets steril im bakteriologischen Sinne. Auch morphologisch bleibt dasselbe unverändert. Am 13. Febr. Impfung von 2 kleinen grauen Meerkatzen, 2 Katzen, 1 Meerschweinchen, 2 Hühnern intramuskulär mit 1 $^1/_2$ ccm defibrinierten Blutes. Das Blut wird J. aus der Vena cephalica entnommen. Die Tiere blieben auch in der Folge gesund.

Insbesondere auch keine Entwickelung von Embryonen der *Filaria perstans*, was übrigens auf Grund früherer Experimente schon von vornherein angenommen worden war. Am 20. Febr., 28. Febr., 4. März, 12. März das Blut dieser Tiere ohne Besonderheiten. 28. März Tiere getötet. Das steril gewonnene Blut zeigt, auf Agar-Agar und Gelatine ausgestrichen, kein Bakterienwachstum. Brutschrank, mit Petroleum geheizt, konnte aus äußeren Gründen nicht angewandt werden, funktioniert auch nicht gut. Die Temperatur des Aufbewahrungsraumes der Gläschen schwankte zwischen 22—28° C. Innere Organe dieser Tiere ohne Besonderheiten. Ganz selbstverständlich muß man sich hüten, solchen negativ verlaufenen Tierexperimenten einen größeren Wert beizumessen, wie es Cagigal und Lepierre mit ihren positiv verlaufenen Tierexperimenten und ihrem angeblichen neuen Bacillus gethan haben.

28. Febr. 1901. J. wird immer schläfriger, muß zum Essen geweckt werden, ißt dann aber mit Appetit. Sowie der letzte Bissen vertilgt, wieder einschlafend. Aufgestanden, kann er sich allein nicht mehr vorwärts bewegen oder höchstens nur einige Schritte und schwankend, um dann kraftlos zusammenzusinken. Dabei bleibt der Ernährungszustand aber äußerlich ein guter. Die Klagen über Kopfschmerzen, namentlich abends, halten an. Die Muskelkraft ist zweifellos gegenüber dem Aufnahmetermin herabgesetzt, ebenso die elektrische Erregbarkeit. Die Antworten sind noch einsilbiger geworden. Die Augen werden nur selten noch ganz für eine kurze Zeit geöffnet. Die geistige Stumpfheit hat zweifellos noch zugenommen. Auffallend ist in den letzten Tagen zunehmende Empfindlichkeit gegen Kühle. J. hüllt sich sorgfältig in mehrere Decken ein. Indes ist die Körpertemperatur nur 1mal auf 35,8° C abends herabgesunken, bleibt sonst zwischen 36—36,3°. Filarien unverändert. Die Färbung derselben gelingt ausgezeichnet mit meiner Färbemethode (Centralbl. f. Bakt. etc. 1898. Heft 25) oder mit Hämotoxylin. Auch der übrige Befund unverändert.

Zahl der roten Blutkörperchen 3 980 720
„ „ weißen „ 22 300.

Zahl der eosinophilen Leukocyten beträgt $^1/_5$ aller Leukocyten. Rote Blutzellen im übrigen morphologisch ohne Besonderheiten. Hämoglobingehalt 54 nach Fleischl. Kur mit Solutio Fowleri, beginnend mit 3mal tgl. 8 Tropfen, innerlich Strychnin nitricum, 3mal tgl. 0,005. Von der Behandlung mit Hodensaft wußte ich damals noch nichts.

1. März. Die Landsleute von J. kamen und sagen, sie kennten die Krankheit wohl. J. würde nun bald sterben. Er müsse jetzt zurück in ihr „Country“, um noch zu seiner Familie zu kommen. Wer die Schwierigkeiten der afrikanischen Arbeiterverhältnisse kennt, wer weiß, wie einzelne Stämme eifersüchtig darauf wachen, daß keiner der Ihrigen seciert wird, versteht, daß J. leider entlassen werden mußte. Am 1. März Photographie von ihm vor dem Reg.-Hospital aufgenommen. Am 4. März mit Wörmann-Dampfer in die Heimat geschickt. Befund der Hautkrankheit unverändert. Späteres Schicksal unbekannt.

Epikrise.

Das vorliegende Krankheitsbild zeigt zweifellos uns einen typischen Fall von Schlafkrankheit der Neger. Leider konnte also kein Beitrag zur pathologischen Anatomie der Schlafkrankheit gegeben werden. Man hat bei derselben bekanntlich einigemale eine Meningoencephalitis gefunden, 1mal auch eine Vergrößerung der Glandula pituitaria, ferner auch Veränderungen der Medulla oblongata. Auch auf die Aehnlichkeit, welche die Schlafkrankheit mit Wernicke's akuter Poliencephalitis superior hätte, ist hingewiesen worden. Indes das ganze epidemiologische und klinische Verhalten zwingt zu der Annahme, daß es sich um eine Krankheit sui generis handelt. Nach mündlichen Mitteilungen des Marinestabsarztes Dr. Richter, den ich auf die Schlafkrankheit in Angola hinwies, hätte Dr. Larranja in Loanda bei den Sektionen keine augenfälligen Veränderungen im Gehirn bemerkt. Fragen wir nun nach der

Aetiologie.

Die Theorie von der Entstehung der Krankheit als bedingt durch verbrecherisch gereichte Gifte, indischen Hanf, Gemütsaffekte, Sonnenstich, Skrofulose etc. ist mit Recht als völlig unhaltbar zurückgewiesen worden und widersprechend den schon oben erwähnten epidemiologischen Thatsachen. Das sind Theorieen vom grünen Tisch, gemacht ohne thatsächliche Kenntnis der Verhältnisse. Daß der uncivilisierte Neger Westafrikas durch Gemütsaffekte nervenkrank werden sollte, dürfte bei seinem Kindernaturell wohl zu den Seltenheiten gehören. Bei den civilisierteren Negern Westindiens ist bei ihrem labilen Seelenleben eine Disposition schon eher geschaffen. Gewiß kommen auch Geisteskrankheiten bei den Negern Westafrikas vor. Ich selbst beobachtete z. B. einen Fall von akuter religiöser Verrücktheit bei einem schwarzen Presbyterianer. Aber eigentliche Nervenkrankheiten sind doch sicher sehr selten in Westafrika.

Erwähnen wir zunächst 1) die Theorie Manson's, welcher *Filaria perstans*, wenn in den Hirngefäßen lokalisiert auftretend, als Ursache annahm. Nun, ich habe *Filaria perstans* so häufig im Blute ganz gesunder Neger gefunden in Kamerun, daß es sehr auffallend wäre, wenn die Filarien nicht wenigstens zuweilen Hirnsymptome machten, die Richtigkeit der Manson'schen Theorie angenommen. Indes, die Schlafkrankheit ist in Kamerun bei den Duala unbekannt. Die Embryonen der *Filaria perstans* sind in Kamerun, wenigstens in der mir bekannten Reihe von Fällen, als harmlose oder ziemlich harmlose Blutschmarotzer zu betrachten, die zur Vermehrung zu bringen durch künstliche Blutüberimpfung auf andere Menschen nicht gelingt, die demnach nur durch Moskitos übertragen werden können. Beiläufig sei an dieser Stelle bemerkt, daß ich wunderbarerweise bei im ganzen mehreren Tausenden von Blutuntersuchungen bei Weißen und Negern Filarien immer nur bei Negern gefunden habe. Dr. Low, abgesandt von der London tropical school und Schüler Manson's, erzählte mir persönlich in Trinidad, daß er in Westindien auch bei Weißen öfter Filarien gefunden, ein neuer Beweis, welche Verschiedenheiten in den einzelnen Tropenländern herrschen. Uebrigens hat man auch oft Schlafkrankheit ohne Vorhandensein von *Filaria*-Embryonen gefunden.

Filaria perstans ist demnach nicht als Ursache der Schlafkranheit zu bezeichnen, die Veränderung der Zirbeldrüse ebenfalls nicht, da man diese nur 1mal gefunden.

2) *Ankylostomum duodenale* und *Rhabdonema strongyloides* kommen auch nicht als Ursache in Frage, aus dem einfachen Grunde, weil sie nur in einem Bruchteile der Fälle gefunden sind, aus demselben Grunde nicht

3) Fränkel's *Diplococcus pneumoniae*, den Marchoux[1]) in ätiologische Verbindung mit Schlafkrankheit bringt, aus demselben Grunde ferner nicht

4) der Bacillus von Cagigal und Lepierre[2]).

Was ist nun die Ursache? — Der Umstand, daß ich Pellagra, jene in manchen Gegenden Italiens so ungemein verbreitete Krankheit, während meiner 6-monatlichen Studienreise in Italien oft und in den verschiedensten Formen studieren konnte, lenkte meine Untersuchung von vornherein auch auf andere Gesichtspunkte. Pellagra ist bekanntlich eine Intoxikationskrankheit, welche auf den längere Zeit hindurch fortgesetzten Genuß von verdorbenem Mais zurückzuführen ist und zu tiefgreifenden Störungen im Nervensystem führt. Es ist Jedem anzuraten, sich vor Beginn des Studiums der Schlafkrankheit mit der Pellagra bekannt zu machen. Ich glaube kaum, daß einer der Autoren, die bis dahin über die Schlafkrankheit geschrieben, Gelegenheit hatten, Pellagra zu studieren. Es ist aber unbedingt notwendig, daß man in der Lage ist, Vergleiche anzustellen. Zum Studium wäre auch die genaue Kenntnis des Lathyrismus und Atriplicismus, die ebenfalls Intoxikationskrankheiten sind und zu Nervenstörungen führen, sehr erwünscht. Beri-beri wird noch weiter unten kurz erwähnt werden.

Schlafkrankheit wird von den Negern, auch von meinen Wey-Negern als Gewährsleuten, als ansteckend vielfach angesehen, und gilt der Speichel besonders als infektiös, der von den Kranken in die gemeinsame Eßschale tropft. Nun, wir werden sehen, daß in der Beobachtung dieser Naturkinder ein Fünkchen Wahrheit liegt, daß aber nicht der Speichel der Kranken, der in die Schüssel fließt, die causa nocens zu sein braucht, sondern der unzweckmäßig bereitete Inhalt der gemeinsamen Schüssel. Es ist nicht notwendig, daß jeder der Speisenden daran erkrankt. Auch innerhalb der schwarzen Rasse giebt es Individuen mit größerer, Individuen mit geringerer Disposition zu einer Krankheit, wie auch in Italien nicht Jeder, der schlechten Mais ißt, an Pellagra erkrankt. Es scheint die Disposition auch bereits hereditär erworben sein zu können. Selbstverständlich können die Hilfsursachen wie schlechte Nahrung überhaupt, Strapazen, Aufregungen, eine große Rolle mitspielen.

Es giebt keine Infektionskrankheit, wenigstens keine, deren Erreger bekannt ist, die sich auf eine einzelne Rasse beschränkt. Gewiß werden manche Rassen von manchen Infektionskrankheiten leichter und eher ergriffen als andere. Ich erinnere an die besondere Disposition der Neger zur Pneumonie. Es ist kein Zufall, daß der Neger

1) Marchoux, E., Rôle du pneumocoque dans la pathologie et dans la pathogénie de la maladie du sommeil. (Annal. de l'Inst. Pasteur. 1899. No. 3.)

2) Cagigal, Antonio Olympio und Lepierre, Charles, A doenca do sommo e o seu bacillo. (Coimbra medica. 1897. No. 30 u. 31.) [Nach Referat Mense's, Archiv f. Schiffs- u. Tropenhyg. 1898. p. 110.]

Westindiens bei Lepraerkrankung in der überwiegenden Mehrzahl der Fälle die tuberöse Form acquiriert, der importierte Kuli Ostindiens dagegen die anästhetische Form, wie ich in Trinidad und Jamaica beobachten konnte. Indes ganz verschont bleibt doch keine Rasse. Die Ohrgeschwulst von Nepal, die Nasengeschwulst der afrikanischen Westküste, die bis dahin scheinbar nur in begrenzten Lokalitäten beobachtet ist, sind in ihrer Stellung in der Pathologie doch noch viel zu wenig bekannt, um hier in Frage zu kommen. Selbst Ainhum, die vorzugsweise bei Negern vorkommende, zur ringförmigen Abschnürung einzelner Zehen führende Krankheit, die ich selbst einmal bei einem Dualla-Neger in Kamerun behandelte, ist auch bei Semiten und Hindus beobachtet worden.

Warum aber nun das ausschließlich oder sicher fast ausschließliche Befallensein der Negerrasse von der Schlafkrankheit? Sichere Fälle, daß auch Europäer daran erkrankt, sind meines Wissens nicht festzustellen. Aber selbst, wenn es wirklich gelänge, später den einen oder anderen Fall von Erkrankung eines Europäers ausfindig zu machen, würde meine zu gebende Erklärung sich auch anwenden lassen, da es leider manche Europäer giebt, welche wie die Neger leben, jedenfallls oft genug mit einer Negerin. Selbst bei Mulatten, welche meist schon etwas besser wie Neger leben, ist die Krankheit nur in ganz äußerst seltenen Fällen beobachtet worden.

Warum aber nun das Verschontbleiben der Kinder bis zum Alter von 2—3 Jahren, das nach meinen Erkundigungen am Congo sowohl wie bei den Wey-Negern sich finden soll, während z. B. Malaria gerade oft die Kinder befällt. Dieses Datum erhält seine interessante Beleuchtung, wenn ich erwähne, daß bis zum Alter von 2, ja bis 3 Jahren die Negerkinder von ihren Müttern gesäugt werden. Das zarteste Kindes- bezw. Säuglingsalter ist ebenfalls von Pellagra ganz oder fast ganz verschont.

Warum bleiben ganze Landstriche verschont von der Schlafkrankheit, werden andere entvölkert, während an der ganzen Westküste Afrikas im allgemeinen wenigstens und schwankend natürlich sehr nach Intensität und Häufigkeit dieselben Krankheiten sich zeigen [1])? Kamerun ist, wie erwähnt, als frei von der Schlafkrankheit zu bezeichnen, nach meinen früheren Erhebungen scheinbar auch die Togoküste. Im Congo aber stoßen nach Mense von der Krankheit heimgesuchte und noch freie Gegenden aneinander.

Die Krankheit soll zwar nach dem Berichte von dem Legat.-Rat Dr. Gleim in Angola zunehmen und in Gegenden auftreten, wo sie früher nicht aufgetreten. Das könnte für eine Infektionskrankheit sprechen, braucht es aber nicht, wie wir sehen werden.

Es giebt viele Gegenden Westafrikas, in denen noch vollkommen moderne kleine Völkerwanderungen vorkommen, wo ein Stamm sich in den anderen wie ein Keil hineinschiebt, seine Gewohnheiten dem anderen mitteilend, neue von dem unterjochten empfangend. Ich erinnere nur an das mächtige Vorwärtsdringen der menschenfressenden Fan-Völker im Kongogebiete nach NW der Küste zu, um in die Handelsbeziehungen zum Weißen Manne treten zu können und das Handels-

---

1) Lepra, die nach Mense am Kongo häufig, scheint allerdings an den Küstenstrichen Kameruns nicht vorzukommen.

monopol der Küstenvölker zu brechen. Ich habe dieses interessante Schauspiel schon bei meinem ersten Aufenthalte in Westafrika 1894/95 im Süden Kameruns und im französischen Congogebiete beobachten können. Es ist durchaus nötig, zu untersuchen, ob diese Völker nicht auf den Wanderungen Nutzpflanzen aus der Heimat mitbringen, die die neuen Nachbarn noch nicht schätzen gelernt haben. Ich erinnere ferner daran, wie in der Jetztzeit, wo Westafrika mit seinen Wunderschätzen erst wirtschaftlich erschlossen wird, Hunderte und Tausende von Arbeitern aus verschiedenen Stämmen fern von ihrer Heimat auf den Plantagen beschäftigt werden, oft ein kleines Völkermuseum inmitten des umwohnenden schwarzen Stammes bildend.

Wahrlich, in Westafrika fehlen die Bedingungen zur Weiterverbreitung einer Krankheit, auch einer Intoxikationskrankheit, nicht. Einzelne Ausnahmen, wie z. B. das scheinbare Fehlen von Lepra im Küstenstrich Kameruns, während Lepra nach Mense am Congo häufig, sind schon erwähnt.

Wenn ferner die Krankheit manchmal erst Jahre nach dem Verlassen der heimgesuchten Gegend auftreten soll, so ist dabei zu berücksichtigen, daß zunächst der sorglos dahinlebende Neger das Auftreten der allerersten Symptome gar nicht bemerkt und wahrscheinlich schon lange an der Krankheit gelitten hat, ohne daß es aufgefallen ist. Der Neger schläft ja schon von Natur gern und viel. Der Tropenarzt, der nachts mit schwarzen Wärtern wachen soll, weiß davon ein Lied zu singen. Vor allem aber geht speziell der Küstenneger selten oder nie allein in ein anderes Land an der afrikanischen Küste. Immer findet er Landsleute, mit denen er dann fast immer zusammenwohnt und zusammenkocht, die Gewohnheiten der Heimat beibehaltend. Fast überall wird er auch mehr oder weniger, wenigstens an der Westküste, dieselben Lebensmittel wiederfinden, allerdings nicht dieselben Lebensbedingungen. Der Duala in Kamerun nährt sich viel anders und besser als der importierte, gewöhnliche, schwarze Arbeiter Oberguineas. Ich zweifle sehr, ob Fälle bekannt sind, daß Neger mehrere Jahre nach dem Verlassen ihrer afrikanischen Heimat in völliger körperlicher und geistiger Gesundheit in europäischen Großstädten lebend und nach europäischer Lebensweise die Krankheit ebenfalls acquiriert haben.

Diese obigen Momente drängen mich zu der Annahme, daß die Schlafkrankheit eine Krankheit ist, bedingt durch chronische Vergiftung mit einem Krankheitsstoffe, der mit der Nahrung aufgenommen wird. Die betreffende Nahrung muß eine sehr verbreitete sein, überall dort, wo Neger sich finden, jedenfalls überall dort, wo die Krankheit sich findet. Beim Durchgehen der Nahrungsmittel kamen, als sehr universell vorkommend, in Frage: getrockneter Seefisch und Maniok oder Kassada. Indes getrockneter Seefisch wird auch konsumiert, wo keine Schlafkrankheit sich findet, Maniok kommt in 2 Varietäten sehr verbreitet vor als Manihot Aipii Pohl und Manihot utilissima Pohl. Die eine ist giftig im rohen Zustande, kann aber gekocht etc. gegessen werden, die andere ist nicht giftig. Es ist nun Thatsache, daß Maniok in den von Schlafkrankheit heimgesuchten Ländern viel roh gegessen wird. Thatsache ist ferner, daß die Zubereitungsart des giftigen Manioks in den einzelnen Ländern recht erheblich verschieden ist. Daß zwischen dem rohen, giftigen Maniok und dem völlig entgifteten viele Zwischenstufen bestehen können, entsprechend

der verschiedenen Zubereitungsart, ist klar. So weiß ich z. B., daß die Dualla den Maniok nur gekocht bezw. geröstet essen, und nachdem sie ihn sehr lange gewässert. Durch Zufall las ich erst jetzt Leg.-Rat Gleim's ausführliche Abhandlung und ersehe daraus, daß er meine Manioktheorie scheinbar nicht acceptierte, da vorher Maniok auch schon gegessen wäre in Gegenden, als dort die Schlafkrankheit noch gar nicht aufgekommen. Diese Frage müßte sich lösen lassen durch genaues Studium an Ort und Stelle, zu welchem Leg.-Rat Gleim selbst dringend auffordert, da die Angaben der Neger sehr unzuverlässig. Jedenfalls habe ich in Kamerun stets an meiner Manioktheorie festgehalten, auch stets bei Erörterungen Aerzten und Laien gegenüber auf meine Gründe hingewiesen. Wie Leg.-Rat Gleim mitteilt, hätte ihm auch ein portugiesischer Arzt von der Maniokwurzel als causa nocens erzählt. Ob jener Arzt von meiner nachweislich schon 1899 geäußerten Anschauung gehört — an der westafrikanischen Küste ist die Fama sehr schnell — kann ich natürlich nicht wissen. Jedenfalls möchte ich daran festhalten, daß ich jene Theorie als erster weiteren Kreisen gegenüber mitgeteilt. Darum auch mein erst in letzter Stunde vereiteltes, lange vorbereitetes Unternehmen, im Mai 1900 mit Empfehlung des Gouvernements nach Angola zu gehen zum Studium jener Krankheit. Zur epidemiologischen Erforschung jener Krankheit ist daher eine systematische Untersuchung der Lebensweise der Einwohner in den heimgesuchten Gebieten und vergleichsweise dazu der nicht heimgesuchten notwendig, insbesondere auch über die Verbreitung der Manihot utilissima und Aipii Pohl in den einzelnen Gebieten und beider Verwendungs- und Zubereitungsart. Wenn wirklich, wie ich bis jetzt anzunehmen mich berechtigt glaube, das Essen von rohem oder unzweckmäßig bereitetem Maniok die Ursache jener Krankheit ist, wird die allgemeine Belehrung der Bevölkerung über zweckmäßige Zubereitung die Krankheit bald zum Schwinden bringen müssen, die jetzt noch dem Congostaate und den Portugiesen ganze Gegenden entvölkert.

Auch das wird zu erforschen sein, ob das Gift, mag es nun Maniok sein oder nicht, je nach den klimatischen Bedingungen des betreffenden Jahres, den tellurischen Bedingungen der betreffenden Gegend, Schwankungen in der Intensität unterworfen ist, so daß in manchen Jahren und in manchen Gegenden die Neger erkranken, in anderen nicht. Soviel ich weiß, ist auch der Solaningehalt der Kartoffeln ein schwankender. Ich erinnere mich, einen Aufsatz Pfuhl's gelesen zu haben, der eine Massenvergiftung von Soldaten durch starken Solaningehalt von Kartoffeln beschrieb. Man könnte mir einwerfen, daß der Europäer in Afrika an entlegenen Plätzen auch Maniok statt der in Afrika im Tieflande nicht gedeihenden Kartoffel ißt. Nun, des Europäers Koch oder Köchin wird ihm sein Gemüse wohl stets gekocht auftragen. Es ist eigentlich erstaunlich, daß nicht schon eher und intensiv auf den obigen Gedankengang hingewiesen wurde.

Einige Erlebnisse aus der Praxis in Kamerun gaben aufs neue Veranlassung, der Frage der Intoxikation in den Tropen näherzutreten. So gelang es mir z. B., eine Pflanze ausfindig zu machen, Ophiocaulon cissampeloides (Planch) Hook., welche zu Vergiftungen verwandt wird, um wie Morchella esculenta Hämoglobinurie zu verursachen. Ueber dieselbe wird demnächst berichtet werden. Ein anderes Mal wurde ich in höchster Eile zu einer Plantage gerufen, auf der bereits 4 Neger am Morgen gestorben, 5 weitere schwer erkrankt

waren. Es bestand die gerechtfertigte Angst, daß noch viel mehr erkranken würden und zeigten auch einige Neuerkrankte bereits Symptome einer beginnenden Erkrankung, die alle Merkmale einer Ptomainvergiftung aufwies. Der betreffende Plantagenleiter glaubte erst an eine Vergiftung aus Verbrechen durch Angehörige eines gewissen anderen Stammes, da er die Wohnungen von 2 Stämmen hatte wechseln lassen und der eine Stamm sehr ungehalten war über das Abtretenmüssen der alten Wohnungen. Die sofort angestellten eingehenden Untersuchungen ergaben, daß mit zweifelloser Sicherheit die Krankheit zurückgeführt werden mußte auf den Genuß von Wasser aus einem Wasserfasse, in welchem der außergewöhnlich stupide Koch der Erkrankten schon seit einigen Tagen einige halbverfaulte Stücke der Papaya- und einer anderen mir ganz unbekannten Frucht hatte herumschwimmen lassen. Die gründlichste Evakuation des Magens und der Därme sowie Analeptika führten bei den Erkrankten schnell Genesung herbei. Indes wollen einige noch über 1 Woche an Kopfschmerzen und Schwäche in den Gliedern gelitten haben. Das kurze Erlebnis steht gewiß nicht im direkten Zusammenhange mit unserem Thema, aber es zeigt, in welcher Richtung auf dem Wege der Schlüsse per exlusionem die Untersuchungen über Schlafkrankheit sich zu bewegen haben. Das Suchen nach immer neuen Bacillen muß der nüchternen kühlen Erforschung der epidemiologischen Thatsachen den ersten Platz abtreten.

Auf diesem Wege sind Männer wie Robert Koch, Manson und Ross, Laveran, Bignami, King etc. zu ihren Schlüssen bezw. der modernen Malarialehre gekommen und ermöglichten dadurch erst die experimentellen Ergebnisse bei tierischer und menschlicher Malaria, die durch sie selbst zum Teil, zum Teil durch Grassi u. A. angestellt wurden. Ob nun meine Behauptung, daß die Schlafkrankheit eventuell eine Intoxikationskrankheit im Sinne der Pellagra ist, gerechtfertigt ist oder nicht, ob meine Hypothese, daß eventuell in erster Linie der Genuß von unzweckmäßig bereitetem Maniok die Krankheit bedingt, sich bestätigt oder nicht, ich glaube mich schon jetzt zu der These berechtigt, daß im Blute der Schlafkranken sich keine nach den üblichen Methoden zur Weiterentwickelung zu bringenden spezifischen Krankheitserreger befinden [1]). Anderweite Beschäftigung hatte bisher die obige Mitteilung verzögert. Die beginnende Reise, welche wieder nach Westafrika führt, wird hoffentlich neues Material bringen. Selbst wenn Verf. auf dem Irrwege wäre, hofft er durch diese Mitteilung die Aufmerksamkeit stärker als bisher auf die Epidemiologie jener hochinteressanten Krankheit hingewiesen zu haben.

---

1) Diese These dürfte auch für die Beri-beri-Kranken zutreffen, soweit sie in Kamerun beobachtet wurden. Das Bild der von mir hier Beri-beri genannten Krankheit in Kamerun verläuft ähnlich wie die von Scheube u. A. gezeichnete Krankheit, scheinbar nur sehr viel leichter, wenigstens in den von mir beobachteten Fällen.

Zur Frage über Differenzierung der Diphtherie- und Pseudodiphtheriebacillen.

[Aus dem bakteriologisch-chemischen Institut von Dr. Ph. Blumenthal in Moskau.]

Von **J. Bronstein** und **G. N. Grünblatt.**

Unter den zahlreichen morphologischen und physiologischen Merkmalen, die die Species Corynebacterium diphtheriae (Lehm.) charakterisieren, muß die Säurebildung, in Uebereinstimmung mit der Ansicht der Mehrzahl der Forscher, als das am schärfsten ausgeprägte und hauptsächlich als ein fast konstantes gelten.

Diese Eigenschaft der Diphtheriekulturen, welche sich in dem Uebergange der gewöhnlichen (neutralen, resp. schwach alkalischen) Reaktion der Nährbouillon in eine saure äußert, war allen Forschern, von Roux und Yersin an, bekannt. Besondere Aufmerksamkeit wurde aber hierauf gerichtet, als Zarniko auf den Umstand hinwies, daß der Pseudodiphtheriebacillus gerade die entgegengesetzten Eigenschaften besitzt. Die flüssigen Kulturen desselben werden alkalischer, als sie vor der Aussaat waren.

Die Litteraturangaben, die diese Frage behandeln, lassen sich in zwei Kategorieen teilen.

Die Arbeiten, die zur ersten Kategorie gehören (Zarniko, Escherich, Prochaska, Günther, Madsen, M. Neisser, Kurth, Schabad etc.), behaupten einstimmig, daß die Säurebildung ausschließlich dem echten Diphtheriebacillus zukomme, obwohl der Grad der Acidität bei den verschiedenen Individuen variiert und die sauere Reaktion der Bouillon nach einer gewissen Zeit wieder in eine alkalische übergeht, daß der Pseudodiphtheriebacillus dagegen gar keine Säure oder höchstens nur ganz minimale Spuren derselben erzeuge.

Die wenigen Autoren der zweiten Gruppe, unter denen Roux und Yersin an erster Stelle genannt werden müssen, behaupten hingegen, daß beide Species Säure geben, daß dieselbe aber bei Bac. pseudodiphthericus schneller in Alkali übergehe.

Gar keinen Unterschied zwischen beiden Arten in Hinsicht der Reaktion ihrer Nährböden sehen Slawyk und Manicatide; Spronck unterscheidet zwei Varietäten des echten Löffler'schen Bacillus: A) säurebildender und B) die Reaktion der Bouillon nicht verändernder Typus.

Außerdem wird von M. Neisser als Ausnahme eine Kultur von Bac. xerosis beschrieben, welche deutlich Säure bildete; weiter stellt Kurth auf Grund dreier Kulturen sogar eine Unterart Bac. pseudodiphthericus acidum faciens auf.

Es ist interessant, den Grund für diese Widersprüche in der Litteratur zu eruieren.

Von den Arbeiten, deren Autoren die Möglichkeit des Vorhandenseins eines avirulenten Diphtheriebacillus (welcher Säure giebt) nicht in Rechnung gezogen haben, wollen wir ganz absehen, aber auch die Arbeiten, die bis 1897 erschienen sind, können für uns wenig Interesse haben, da die Autoren derselben ein so wertvolles Kennzeichen, wie

das Verhalten der betreffenden Kulturen zu der Neisser'schen Färbung, nicht zur Identifizierung der Arten benutzen konnten.

Der Kernpunkt der angeregten Frage liegt nach unserer Meinung in der Methode der Reaktionsbestimmung der Nährbouillon. Einige Autoren geben überhaupt nicht die Methode an, welche sie bei dieser Bestimmung benutzt haben, die Mehrzahl der übrigen gebrauchte Lackmus — und hierin sehen wir den Grund der Fehler. Lackmus ist ein Reaktiv, das sich äußerst unempfindlich gegen Säure verhält; es ist imstande, die Aciditätszunahme erst dann anzugeben, wenn sich auf ein Liter Bouillon wenigstens 10 ccm Normalsäure gebildet hat, und der Grad der Acidität der Diphtheriekulturen übersteigt im Mittel nicht diese Ziffer.

Deshalb wurde von Neisser eine sichere Methode vorgeschlagen, welche in der Titration der Bouillonkulturen mit 1-proz. NaOH und Phenolphtaleïn als Indikator auf freies Alkali bestand. Hierbei zeigte die Normalbouillon (schwach alkalisch gegen Lackmus und sauer gegen Phenolphtaleïn) in den ersten 24 Stunden des Wachstums des Löffler-schen Bacillus eine Aciditätszunahme, die gleich war 0,07 ccm 1-proz. NaOH, und nach 24 Stunden 0,29 ccm, während der höchste Grad der Säurebildung der diphtherieähnlichen Bacillen nach seiner Bestimmung nur gleich 0,064 ccm 1-proz. NaOH war. „Ich muß demnach die Säureproduktion“, schließt Neisser den betreffenden Abschnitt, „als ein völlig konstantes Merkmal der Diphtheriebacillen und die oben angeführte Art der Untersuchung, besonders wenn vergleichend angestellt, als ein wesentliches differential-diagnostisches Hilfsmittel ansehen.“ (Zeitschr. f. Hyg. Bd. XXIV. 1897. p. 45). In der letzten Zeit hat Schabad die angeregte Frage von allen Seiten betrachtet und giebt ebenfalls der Titration mit Phenolphtaleïn als Indikator den Vorzug. Er hat die erhaltenen Daten auf ein Liter Bouillon umgerechnet.

Die Acidität der normalen Bouillon, welche im Mittel gleich war 6,0 ccm einer Normalalkalilösung, steigerte sich bei Schabad bis zu 10,8 ccm im Mittel und bis 24,0 ccm als Maximum bei dem Wachstum der Löffler'schen Stäbchen und nur bis 1,0 ccm bei dem Hoffmann-Wellenhof'schen Bacillus. Größtenteils jedoch gaben die Pseudodiphtheriebacillen direkt Alkali. Schabad, welcher 44 Diphtherie- und 5 Pseudodiphtheriekulturen untersucht hat, kommt zu dem Schlusse, „daß die Veränderung der Reaktion der Bouillonkultur ein durchaus beständiges und deutliches Erkennungszeichen ist. Wir persönlich sahen keine Ausnahme ....“ (Jahrb. f. Kinderheilk. N. F. Bd. LIV. p. 436.) Wen die Details der Technik interessieren, den verweisen wir auf die eingehende Arbeit Schabad's und gehen nun auf die Beschreibung der eigenen Versuche in dieser Richtung über.

Indem wir diesen konstanten Unterschied des echten von dem Pseudodiphtheriebacillus durch obengenannte Arbeiten der verschiedenen Autoren für im angeführten Sinne vollkommen bewiesen voraussetzten, stellten wir uns die Ausarbeitung einer einfacheren, in der Praxis anwendbareren Methode für die Feststellung der Reaktionsveränderung, z. B. durch Farbenreaktionen, zur Aufgabe.

Nach einer längeren Reihe von Versuchen blieben wir bei dem Mankowski'schen Reagens stehen.

Dieses Reagens, welches, wie bekannt, von dem Autor zur Differenzierung des Typhusbacillus von dem Colibacillus empfohlen worden war, bildet ein Gemisch einer Lösung von Säurefuchsin, welches durch

eine 1-proz. Lösung von KOH neutralisiert wurde und einer Lösung von Indigokarmin. Die auf diese Weise erhaltene Flüssigkeit ist äußerst empfindlich gegen Reaktionsveränderungen, indem ihre blaue Farbe bei Gegenwart der geringsten Spuren von Säure in rot, von Alkali in grün übergeht[1].

Bei Benutzung dieser Flüssigkeit zur Bestimmung der Reaktion der Diphtherie- und der Pseudodiphtheriekulturen traten uns jedoch im Anfange Schwierigkeiten entgegen. Die gewöhnliche Bouillon, welche neutral (oder schwach alkalisch) gegen Lackmus war, reagierte gegen das Mankowski'sche Reagens sauer, stellten wir aber die Reaktion der Bouillon mit Phenolphtaleïn ein (neutral), so erhielten wir mit der Mankowski'schen Flüssigkeit stark alkalische Reaktion. Man muß deshalb bei der Benutzung der Mankowski'schen Flüssigkeit die Bouillon ganz speziell bereiten (Fleischpeptonbouillon mit $^1/_2$-proz. Glukosegehalt), indem man die Reaktion mit dem Reagens selbst derartig einstellt, daß sich die Farbe der Flüssigkeit nicht verändert. Außerdem muß man, da diese Bouillon bei längerem Stehen an der Luft CO^2 anzieht und dadurch wieder sauer zu reagieren anfängt, die Reaktion unbedingt (vor der Endsterilisation) bei Thermostatentemperatur einstellen und überhaupt nach Möglichkeit in ganz frischem Zustande benutzen.

Bei der Bereitung des Reagens mußten wir ebenfalls ein wenig von der Vorschrift Mankowski's abweichen. Wir bereiteten es folgendermaßen: a) 2,0 Indigokarmin wurde in 100,0 Aq. dest. gelöst und b) 10,0 Säurefuchsin in 100,0 1-proz. KOH. Diese Lösungen wurden vor dem Gebrauche in folgender Proportion gemischt: 2 Teile von der Lösung a + 1 Teil der Lösung b + 22 Teile Aquae dest.

Die Ausführung der Reaktion ist eine durchaus einfache. Die Reagensgläser mit je 5 ccm Bouillon von oben beschriebener Zusammensetzung werden mit einer nach Möglichkeit gleichen Menge der zu untersuchenden reinen Kulturen geimpft und dann in den Brutschrank zur Kontrolle zusammen mit reiner Bouillon gebracht. Nach ca. 24 Stunden fügt man in jedes Reagensglas je 3 Tropfen des Mankowski'schen Reagens hinzu. Die normale Bouillon färbt sich sofort schön blau, die Kulturen des Bac. Loeffleri rubinrot und die Pseudodiphtheriekulturen grün (letztere Färbung tritt erst nach einigen Minuten auf).

Bei weiterem Stehen mit dem Reagens zusammen färben sich die Pseudodiphtheriekulturen ebenfalls durch die Mankowski'sche Flüssigkeit rot, aber dies geschieht erst nach 12 Stunden, in den ersten Stunden fällt der Farbenunterschied scharf in die Augen. Bei den 2 Tage alten Kulturen (Diphtherie) war die Aciditätszunahme noch stärker ausgeprägt, am 3. Tage etc. blieb sie unverändert.

Der Grad der von den Pseudodiphtheriekulturen gebildeten Alkalität hielt sich die ganze Zeit auf gleicher Höhe.

Ueber die Beständigkeit des von uns vorgeschlagenen Versuches konnten wir uns an 40 Diphtherie- und 10 Pseudodiphtheriekulturen überzeugen, und glauben deshalb die Hoffnung aussprechen zu dürfen, daß man sich unter Benutzung desselben, namentlich neben anderen erprobten Methoden (mikroskopisches Aussehen, physiologische Besonder-

---

1) Mankowski, A. F., Eine Methode zur schnellen und leichten Unterscheidung der Typhuskulturen von den Kulturen des Bact. coli communis. (Russ. Arch. f. Path. etc. und Centralbl. f. Bakt. 1900. No. 1.)

heiten, Polfärbung nach Neisser), leicht und rasch orientieren kann bei der Differenzierung der Diphtherie- von den Pseudodiphtheriekulturen. Es sind natürlich weitere Vergleichsversuche durchaus wünschenswert, die nach Möglichkeit ein noch reicheres Material umfassen.

Ueber die Bakterienflora der Nasensini und des Mittelohres.

[Hygienisches Institut der Kgl. Universität Turin, unter Leitung des Herrn Prof. Dr. L. Pagliani.]

Von Dr. **U. Calamida** und Dr. **E. Bertarelli,** Privatdocent.

(Ins Deutsche übertragen von Docent A. Wihlfahrt, Turin.)

Verschiedene Forscher haben die Beschaffenheit des normalen Mittelohres vom bakteriologischen Standpunkte aus eingehend studiert, eine große Zahl derselben auch die des kranken Ohres, und dabei nicht unterlassen, auch die möglichen Eintrittswege und das leichte Eindringen der Mikroorganismen in die Paukenhöhle festzustellen. Aus allen unseren Nachforschungen aber ergiebt sich nicht, daß irgend ein Forscher sich mit der Bakterienflora der normalen Nasennebenhöhlen beschäftigt hätte, während viele ihre Versuche an den kranken Höhlen angestellt haben.

Und doch ermangeln die betreffenden Beobachtungen sicherlich nicht einer gewissen Bedeutung für die genaue Aetiologie der Sinusiten. Wir glaubten infolgedessen, daß eine bakteriologische Prüfung der normalen Höhlen und genauere Feststellungen über die Leichtigkeit, mit welcher Keime in dieselben eindringen, nicht ohne Interesse sein dürfte. Gleichzeitig haben wir, einmal im Besitze des erforderlichen Materiales, auch die über den Bakteriengehalt des Mittelohres gemachten Nachforschungen kontrolliert.

Dies eben gerade, weil die Autoren über die Gegenwart von Keimen in der normalen Paukenhöhle uneinig sind. Zaufal[1]) hat zuerst in dieser Richtung Experimente mit Kaninchen vorgenommen und behauptet, in der normalen Paukenhöhle die Existenz einer sehr kleinen Zahl saprophytischer Keime konstatiert zu haben. Dieser Autor hält dafür, daß der Eintritt der Keime — auch bei normaler Trompete — in das Mittelohr stattfinden könne, wenngleich dies auch nicht gerade leicht sei.

Netter[2]) will bei 20 Sektionen von Kindern im Alter von 9 Tagen bis 2 Jahren im Mittelohr alle Bakterienformen der Mittelohrentzündung Erwachsener angetroffen haben. Doch waren die Nachforschungen an solchen Kindern angestellt worden, die mit jenen Infektionsformen starben, die gewöhnlich neben Mittelohrentzündung auftreten.

Gradenigo und Penzo[3]) führten ihre Nachsuchungen an Leichen von Kindern (Frühgeburten, und Kindern im Alter von einigen Tagen bis einigen Monaten) durch, deren Tod nach Formen eintrat, die sich

---

1) Zaufal, Prag. med. Wochenschr. 1889. 6—12—16—36.

2) Netter, Des altérations de l'oreille moyenne chez les enfants en bas âge. (Comptes rendus de la Société de Biologie. 1889. p. 305.)

3) Gradenigo e Penzo, Osservazioni batteriologiche sul contenuto della Cavità timpanica nei cadaveri di neonati e bambini lattanti. (Giorn. R. Accad. di Med. Torino 1890.)

gewöhnlich nicht mit Mittelohrentzündung komplizieren, und stellten dabei die Gegenwart von Saprophyten im Mittelohr fest, die sie jedoch auf die bei solch delikaten Organen rasch erfolgende Verwesung zurückführen.

Lannois[1]) fand bei seinen Kontrollversuchen zwecks Feststellung der normalen Mikrobenflora im Mittelohr der Hunde, daß die Paukenhöhle steril ist.

Auch Preysing[2]) beobachtete bei seinen zahlreichen Experimenten an Kadavern fast immer, daß die Paukenhöhle frei von Mikroorganismen war.

Citelli[3]) kommt nach seinen an Hunden und Kaninchen vorgenommenen Studien zu dem Schlusse, daß sich im normalen Zustande im Mittelohr keine Keime oder doch nur äußerst wenige vorfinden. Dieser Autor hat sich außerdem mit der Art und Weise des Eintritts der Mikroorganismen aus der Nasenrachenhöhle in die Paukenhöhle beschäftigt und dabei gefunden, daß die Eustachi'sche Röhre unfähig ist, in allen Fällen den Durchgang der Keime zu verhindern; diese können also von der Trompete zum Mittelohr gelangen.

Unsere Nachforschungen haben sich gleichzeitig auf Paukenhöhle und die anderen Höhlen erstreckt (wie Kiefern-, Stirn- und Ethmoidalhöhlen). Die hierbei verfolgte Technik ist an und für sich sehr einfach, verlangt aber immerhin strenge Vorsichtsmaßregeln zur Vermeidung von Verunreinigung.

Unser Versuchsmaterial waren junge und erwachsene Hunde verschiedener Rassen. Vorgezogen haben wir gerade diese Tiere, weil bei ihnen die Nebenhöhlen stark entwickelt sind. Mit anderen Tieren derselben Species wurden dann, wie wir weiter unten ausführen, noch direkte Versuche angestellt, die die Leichtigkeit des Uebergangs der Keime aus dem Nasenrachenraum in besagter Höhle darthun sollten. Zum Studium der Bakterienflora der Kavernen hatten wir 12 außerordentlich frisch erhaltene Leichen zur Verfügung.

Nach Beendigung der Experimente wurden die Tiere mittels Verblutung oder Chloroform getötet, wobei wir im Gegensatz zu den Resultaten anderer Forscher niemals konstatierten, daß das Chloroform die bakteriologischen Verhältnisse der Schleimhäute zu modifizieren imstande ist, selbst dann nicht, wenn wir die Keime künstlich in die Höhlen einführten. Unter Beobachtung der üblichen antiseptischen Normen wurde die uns interessierende Region vollständig freigelegt. Mit den Frontalhöhlen verfuhren wir folgendermaßen: Nach Abschabung der Stirnknochenhaut mit einem sterilisierten Periostlöser brachten wir mit Hilfe steriler Skalpelle eine mit dem Sinus korrespondierende Knochenöffnung an, wobei die den Sinus selbst überziehende Schleimhaut intakt bleiben muß, was ziemlich gut gelingt. Hierauf wurde die Mucosa mit einer glühenden Spitze angebohrt, um der Oese den Durchgang zu ermöglichen. Ein gleiches Vorgehen wurde auch bei den anderen Höhlen be-

---

1) Lannois, M., Otite moyenne catarrhale aiguë et microbes. (Société otol. de Paris 1896. — Arch. intern. de Laryng. 1896. p. 295.)

2) Preysing, La caisse du tympan chez l'homme sain est sans germes. (Arch. of Otol. 1899. — Ref. in Ann. des Mal. de l'Oreille. 1902. Februar.)

3) Citelli, Ricerche batteriologiche dell' orecchio medio in condizioni normali. (Arch. ital. di Otol. Vol. XI. 1901.)

obachtet, nur mit dem kleinen Unterschiede, daß zur Oeffnung der soliden Schleimhaut der Kieferhöhle die Schere zur Anwendung kam.

Auch bei Prüfung des Ohres wurde zuerst die ganze Gegend freigelegt, dann die membranöse Röhre von der Knochenröhre abgetrennt, so daß die Muskelinsertionen auf diese Weise eine weite Oeffnung erhalten. Mit sterilen Instrumenten demolierten wir hierauf die Knochenwand und bohrten zur Passage der Oese die Paukenmembran an, oder aber wir öffneten uns den Weg von der Bulla so weit, daß wir in die Höhle gelangen konnten.

Nun hat jedoch auch der Oesenkontakt seinen Mißstand. Fährt nämlich die Oese über die Schleimhaut, so wird dadurch eine kleine Quantität Material abgetragen, und man hat nie die Gewißheit, die wenigen eventuell auf der Schleimhaut selbst gelegenen Keime entfernt zu haben. Wir hielten es daher für konvenient, zuerst entweder steriles Glycerin, Bouillon oder gewöhnliches sterilisiertes Wasser anzuwenden, da es auf diese Weise leichter ist, die Keime abzutragen. Die Kulturen wurden nach den gewöhnlichen Methoden ausgeführt, wobei wir die verschiedensten Nährböden heranzogen, auch glukosierte für Blastomyceten; fast immer gingen damit dann auch anaërobische Kulturen Hand in Hand. Im allgemeinen haben wir uns mit isolierenden Kulturen auf soliden Nährböden begnügt, da wir die Keime in geringer Zahl wähnten; in einigen Fällen bedienten wir uns auch der Plattenkulturen. Die isolierten Mikroorganismen wurden mit Hilfe der gewöhnlichen Prüfungsmethoden identifiziert, in unsicheren Fällen schritten wir zur Inokulation von Tieren. Es sei hier noch erwähnt, daß die Befunde, die aus Höhlen mit nicht ganz gesunder Schleimhaut stammten, selbstverständlich ohne weiteres unbeachtet blieben, und daß die Untersuchungen stets an den Höhlen beider Seiten (rechts und links) vorgenommen wurden.

Da es zweifellos zu weit führen würde, den Befund aller Experimente einzeln vorzubringen, so geben wir hier die bei Hunden erhaltenen Resultate summarisch wieder:

Die bei 20 Hunden verschiedensten Alters — mit gesunder Schleimhaut — geprüften Frontralhöhlen haben sich trotz aller möglichen Kulturversuche beiderseitig steril erwiesen. In einem einzigen Falle und auf einer Seite nur war es möglich, einen Bacillus zu isolieren, dessen kulturelle und morphologische Eigenschaften denen des Coli-Bacillus stark ähneln, ohne aber bei Meerschweinchen und Kaninchen pathogene Kraft zu besitzen. Bei einem anderen Falle haben wir Proteus-Bacillen isoliert, die wahrscheinlich von einer Verunreinigung herrührten.

Die an den Ethmoidalhöhlen von nur 8 Hunden angestellten Versuche haben konstant steriles Resultat ergeben.

Die Kieferhöhlen waren in 16 Fällen von 20 bacillenleer. In den übrigen Fällen isolierten wir einen Coccus aurantiacus und einen Micrococcus albus, dann einen Coccus aurantiacus und einen anderen, aus langen Elementen bestehenden, mit den gewöhnlichen Tafeln allein nicht identifizierbaren Bacillus. Beim zweitletzten Falle fand sich ein äußerst virulenter Staphylococcus albus, der bei Meerschweinchen 24—36 Stunden nach Peritonealinjektion mit $^1/_{10}$ ccm Bouillonkulturen den Tod bewirkte. Beim letzten Falle wurde ein Mykoid isoliert.

Von Menschenleichen wurden im ganzen 12 zur Untersuchung herbeigezogen, eine relativ beträchtliche Zahl, wenn man in Betracht zieht, daß wir ausschließlich Leichen solcher Individuen gewählt haben, die nicht Infektionskrankheiten unterlegen waren (4 waren nach Trauma verstorben, 1 infolge von Apoplexie, die übrigen nach chirurgischen Eingriffen bei Hautsarkomen, Eingeweideverstopfung etc.). Bei allen Kadavern fand die Untersuchung der Höhlen zur Winterszeit wenige Stunden nach erfolgtem Tode statt, niemals aber nach der 20. Stunde.

Die Untersuchungen haben bei allen Höhlen negatives Resultat ergeben, nur in einem einzigen Falle konnten wir in einer Frontalhöhle eines nicht pathogenen Staphylococcus albus habhaft werden.

Die den Mikrobengehalt der Paukenhöhle betreffenden Kontrollversuche wurden nur an Hunden vorgenommen, weil über solche Experimente beim Menschen schon zahlreiches Material existiert. Bei 20 Hunden hatten wir 17mal in beiden Paukenhöhlen negatives Resultat. In einem Falle isolierten wir einen für Laboratoriumstiere nicht pathogenen Staphylococcus aureus; in einem zweiten Falle konstatierten wir auf einer Seite einen stark entwickelten Diplococcus, dessen mikroskopisches Bild und Kulturenbefund in nichts von dem Meningococcus Weichselbaum's abwich. Dieses interessante Faktum mußte unsere Aufmerksamkeit in Anspruch nehmen. Wir stellten also zahlreiche Versuche an, die einzig und allein das kulturelle und morphologische Verhalten des isolierten Mikroorganismus im Auge hatten, und konstatierten dabei, daß es mit dem des Meningococcus parallel ist. Die Kulturen — auf verschiedenen Nährböden — und Präparate waren dann auch identisch mit jenen, die Vanzetti[1]) im Jahre 1901 im Institut für pathologische Anatomie von Turin mit dem isolierten Meningococcus vorgenommen hatte, von denen wir welche besaßen.

Nach Verimpfung auf allen Wegen in Meerschweinchen, Mäuse und Kaninchen blieb jede Reaktion aus. Ziegen, die für Meningococcus sehr empfindlich sind, konnten wir nicht zur Verfügung haben. Wenn wir also auch nicht behaupten können, daß der von uns isolierte Mikroorganismus wirklich der Meningococcus ist, so verdient der interessante Befund doch sicherlich in Betracht gezogen zu werden.

Beim letzten Falle gelang es uns, aus einer Paukenhöhle einen bei Tieren inaktiven Staphylococcus cereus zu isolieren.

Außerdem haben wir auch die Trompete in verschiedenen Tiefen untersucht; dieselbe war in der Hälfte aller Fälle in ihrem oberen Teile steril; bei allen anderen Fällen fanden sich zahlreiche Keime von gegeringem pathogenetischen Interesse, deren Beschreibung wir somit der Kürze wegen unterlassen.

Zum Studium der Leichtigkeit des Durchgangs der Mikroorganismen von der Nasenrachenhöhle und der Nase nach den Sini und dem Ohre haben wir aus oben schon angedeuteten Gründen wiederum Hunde verwandt. Wir brachten also Kulturösen auf die Schleimhaut der angegebenen Höhlen, wobei wir uns natürlich leicht erkennbarer und nicht pathogener Mikroorganismen bedienten (Bacillus prodigiosus, B.

1) Giorn. della R. Accad. di Med. di Torino. 1901.

pyocyaneus, B. subtilis), weil eben kein spezieller Grund vorlag, letztere zu Versuchen zu gebrauchen, bei denen wir nur ein mechanisches Faktum studierten. Wir konstatierten jedoch sofort, daß die Uebertragung der Mikroorganismen auf die Schleimhaut mit Hilfe der Oese wenig Gewähr leistet, da man eben mit der Oese leicht Gefahr läuft, das Material zu weit von den Gängen anzubringen, die zu den Sini und dem Ohre führen.

Gerade deshalb haben wir bei zahlreichen Experimenten durch die Mundhöhle in die Nasenlöcher und den Rachen Bouillonkulturen der vorerwähnten Mikroorganismen eingeführt, und dies vermittelst einer Spritze. Es ist wohl überflüssig, zu bemerken, daß zu diesen Einspritzungen im allgemeinen geringe Quantitäten (1—2 ccm) Bouillonkulturen verwandt wurden — die dann mit so leichtem Drucke zur Einführung kamen, daß sie aus der Spitzenkanüle tröpfelten — und daß man von allen jenen Hunden Abstand nahm, bei denen die Injektion zu Reflexen (Husten, Niesen) Veranlassung gab, welche das Eindringen der Keime erleichtern konnten.

Die Tiere wurden dann meist 8—24 Stunden nach erfolgter Bouillonkultureninjektion getötet.

Diese Experimentiermethode kam bei 18 Hunden zur Anwendung. Bei 10 derselben mit Bacillus prodigiosus. Dabei fanden wir in 3 alle Sini und das Ohr steril; ein Tier gab positiven Befund: B. prodigiosus in der Kieferhöhle, Stirnhöhle und im Ohre. In anderen 3 Fällen ebenfalls positives Ergebnis, aber nur in der Kieferhöhle; in wieder einem anderen fanden wir Bacillen in Kiefer- und Stirnhöhle. Im vorletzten Falle wurde B. prodigiosus nur in der Stirnhöhle konstatiert, und im letzten Falle nur im Mittelohr.

Die beiden mit B. pyocyaneus behandelten Tiere ergaben negatives Resultat.

Mit B. subtilis wurden 6 Hunde injiziert. Von diesen gaben 4 ein negatives Resultat; bei einem trafen wir den Bacillus in der Kieferhöhle, und beim letzten in dieser und der Frontalhöhle.

Wo wir ein positives Resultat konstatierten, handelte es sich fast ausschließlich um Tiere, die 8—10 Stunden nach der Inokulation der Keime getötet worden waren, während die Höhlen der 4—6 oder 18 bis 24 Stunden nach Inokulation getöteten Tiere, einen einzigen Fall ausgenommen, stets steril waren. Eine besondere Bedeutung können diese Zahlen natürlich angesichts der beschränkten Anzahl von Versuchstieren nicht beanspruchen. Doch geben uns vorstehende Daten immer einige Fingerzeige. Vor allem ist hiermit erwiesen, daß die Passage der Keime aus den Nasenlöchern und dem Rachen in die sinusalen und Paukenhöhlen auch in normalen Konditionen und auch ohne vorhergegangene Alteration der Schleimhäute mit großer Leichtigkeit erfolgen kann. Die Passage nach der Kieferhöhle ist erwiesenermaßen die leichteste; weniger leicht jene nach der Frontalhöhle, am schwierigsten der Durchgang nach dem Ohre. Bezüglich der Ethmoidalhöhlen fehlen uns beachtenswerte Daten. Schließlich sei noch darauf hingewiesen, daß unsere Beobachtungen bezüglich des Ohres nicht genau mit denen Citelli's übereinstimmen, insofern als dieser versichert, sehr oft den Durchgang der Keime nach dem Mittelohr verifiziert zu haben.

Die größere Leichtigkeit, mit der der Durchgang der Keime nach der Kieferhöhle erfolgt, erklärt sich ohne weiteres aus der anatomischen

Lage, während andererseits die anatomische Konstitution des Ohres, das mit einem Schutzapparat — den Eustachi'schen Tuben — versehen ist, die Schwierigkeit des Durchgangs der Mikroorganismen nach diesem Organ rechtfertigt.

Wurde nun auch der Zeitpunkt, an dem die Mikroorganismen sich nach Einführung in Nase und Rachen in den erwähnten Höhlen vorfanden, nicht außer Acht gelassen, so glaubten wir ihm doch keine besondere Bedeutung beilegen zu müssen. Wollte man dies aber thun, so könnte man bemerken, daß eine gewisse Stundenzahl (8—10) nötig ist, damit die Passage in die Sini oder ins Ohr erfolgt, daß nach einer gewissen Zeit (18—24 Stunden) in vielen Fällen die Keime verschwinden, vielleicht infolge einer einfachen mechanischen Wirkung, die durch die wieder eintretenden Sekretion der Schleimhaut bedingt ist, oder vielleicht auch infolge der Natur des Sekretionsprodukts der Schleimhäute selbst.

Gestützt auf unsere Nachforschungen, kommen wir zu nachstehendem Resultate:

Bei normalen Verhältnissen sind beim Hunde und beim Menschen die Frontal- und Ethmoidalsini fast konstant steril, während die Sterilität der Kieferhöhlen beim Hunde weniger konstant, beim Menschen dagegen viel häufiger ist. Auch das Mittelohr ist beim Hunde fast immer steril. Von den wenigen isolierten Keimen hat sich nur ein einziger, einer Kieferhöhle entnommen, ein Staphylococcus albus, Tieren gegenüber pathogen erwiesen. Ein anderer aus dem Ohre isolierter, ein Diplococcus, dem wir aus verschiedenen Gründen Aehnlichkeit mit dem Meningococcus Weichselbaum's zuschreiben können, ist zum mindesten verdächtig erschienen.

Ueberdies haben wir feststellen können, daß die Passage der Mikroorganismen bei normalen Schleimhäuten leichter nach der Kieferhöhle, weniger leicht nach der Frontalhöhle und am schwierigsten nach der Paukenhöhle erfolgt.

Ueber eigenartige Parasitenfunde bei Syphilis.

Ihre Bedeutung für die Entstehung, Diagnose und Ausbreitung dieser Infektionskrankheit bei Erwachsenen und Kindern, sowie für die Beziehungen der Syphilis zu anderen Krankheitsprozessen.

Von Prof. Dr. **Max Schüller**, Berlin.

Mit 6 Tafeln.

(Fortsetzung.)

Auch bei einer Initialsklerose an der Oberlippe, welche ich im Sommer 1900 nebst der dazu gehörigen harten Unterkinndrüse bei einer jungen Frau exstirpierte, fand ich in dem Schorf, der die Mitte bedeckte, da und dort einzelne leere große Kapseln, sowie verschieden große junge Organismen eingeschlossen. Bei einer Reihe von einigen 50 aufeinander folgenden, parallel zur Oberfläche gemachten Mikrotomschnitten eben dieses Oberlippenschankers, von welchen jeder Schnitt sofort vom Messer auf das Objektglas übertragen und zunächst ohne

jeden anderen Zusatz mikroskopisch betrachtet wurde, waren fast in jedem Schnitte nach der Tiefe zu einzelne große Kapseln und zuweilen pigmentierte junge Organismen im Gewebe zu bemerken. Später habe ich diese Schnitte und eine andere Serie senkrecht zur Oberfläche angefertigter Schnitte teils ungefärbt mit verschiedenen Salzlösungen, teils nach verschiedensten Methoden gefärbt untersucht. In der Mitte über der stark entzündlich infiltrierten und wie von einer erstarrenden interstitiellen Masse durchgossenen sklerosierten Partie ist die fehlende Epitheldecke ersetzt durch einen ziemlich dicken (diphtheritisähnlichen) Schorf, der aus einer feinfädigen fibrinösen Masse besteht, in welcher noch vereinzelte degenerierte Epithelien, auch kleine Partieen verhornter Deckzellen zu erkennen sind, der aber besonders von zahlreichen weißen Blutkörperchen zwischen der fädig-körnigen Masse gebildet ist. Nach den Seiten geht der Schorf über die hier noch erhaltene, aber oberflächlich erodierte und von Wanderzellen durchsetzte Epitheldecke hin, mit ihr verschmolzen, wie es scheint, durch ein die obersten Epithelzellen infiltrierendes, zum Teil schon sich organisierendes Blutgerinnsel. In dem centralen Teile des Schorfes lassen sich nun einzelne feine, gewundene Gänge mit Parasiten erkennen, aber auch einzelne ziemlich große junge Organismen in besonderen Räumen oder Spalten, sowie zuweilen zahlreiche kleinere junge Organismen in Reihen und diffus verstreut. Von den Gängen habe ich einen leeren nach einem ungefärbten Schnitte und einen mit Parasiten gefüllten nach einem gefärbten Präparate, die großen jungen Organismen im Schorf nach einem anderen, gleichfalls gefärbten Schnitte abgebildet (s. Taf. II, Fig. 15, 16, 17). Auf Taf. III, Fig, 30 gebe ich ein Bild nach einem ungefärbten, in Oel aufgehellten Schnitte. Parasiten sind auch unterhalb des Schorfes noch in dem sklerosierten Binde-, Muskel- und Fettgewebe zu verfolgen. Sie bilden hier zusammenhängende Ketten und Gruppen, welche ich besonders schön im entzündlich infiltrierten und sklerosierten Fettgewebe an zahlreichen teils gefärbten, teils ungefärbten (mit Ammon. mur. oder mit Rhodankalium behandelten) Schnitten studiert habe (s. Taf. II, Fig. 18). Seitlich von der Mitte, wo der Schorf auf der Epithelschicht aufliegt, kann man in letzterer kleine Reihen, meist länglich-ovaler oder birnförmiger junger Parasiten erkennen, während die Kerne der Epithelien vielfach Karyokinesen oder Zerfall in Körnchen zeigen. An anderen Stellen sind die Epithelzellen durch eingedrungene Wanderzellen zwar aus ihrem festen Verbande gedrängt, aber weniger im Zerfall begriffen. Nach diesen Präparaten gewinnt man den Eindruck, daß hier bei dem infektiösen Kuß wahrscheinlich durch eine kleine verletzte Stelle der Epitheldecke die Parasiten direkt eingeimpft wurden.

Das Bindegewebe des entzündlich indurierten syphilitischen Infektionsherdes ist nun auch weiterhin nach Tiefe und Breite von diesen Parasiten durchsetzt. Man kann es ohne weiteres hier schon aus den großen Kapseln erschließen, welche gelegentlich einzeln oder zu mehreren aus der Schnittfläche heraustreten. Auch kleinen abgerissenen oder abgeschnittenen Partieen von einem feinfädigen Maschenwerke, auch hier der Begleiter großer Kapseln, wie bei Carcinom und Sarkom, begegnet man hin und wieder. Bei Oelaufhellung sind in den Geweben dieser tieferen Partieen die großen Kapseln und die jungen Organismen oft weit schwieriger zu finden, nicht nur, da sie auch selber stark aufgehellt werden, sondern besonders, weil sie dicht verhüllt innerhalb der

Zellenmasse und in dem derben Gewebe gleichsam eingepackt liegen. Aus meinen Beobachtungen ersehe ich, daß besonders auch relativ große runde, kapselähnliche junge Organismen nicht nur zwischen, sondern vielfach in Zellen liegen, in welchen sie als kleinste Organismen eindrangen. Beim Wachstum dehnen sie — aber niemals in solchem Grade wie bei Carcinom[1]) — die Zellen aus, so daß schließlich der zur kleinen Kapsel gewordene Parasit noch mit einer feinen Hülle von seiten der Wirtszelle versehen ist, was natürlich auch die Schwierigkeiten des Erkennens der Kapseln vermehrt. Doch ist es mir mit meinen verschiedenen Untersuchungsmethoden an in verschiedenen Richtungen hergestellten Schnitten eventuell unter Benutzung der Zerfaserung bei Aufhellung .mit Oelen oder mit Salzlösungen recht gut gelungen. Es gelingt überdies auch an gefärbten Präparaten. Für die Darstellung der Form der Parasiten scheinen mir manche der wässerigen Aufhellungsmethoden sogar den Färbungen weit überlegen zu sein. Nur ausnahmsweise gewähren hier Färbungen bessere Dienste. Gerade einer Form, welche etwa in der Mitte zwischen der großen Kapsel und einem jungen Organismus steht (s. Taf. II Fig. 20 a, b, c), nämlich nicht die Größe der großen Kapseln erreicht und mehr den Charakter eines größeren jungen Organismus von runder Gestalt trägt, aber häufig schon Körner (Sporen?) oder kleinste junge Organismen im Inneren birgt, die man hier gelegentlich im Bindegewebe der Initialsklerose trifft, werden wir wieder begegnen in allen späteren Stadien der Syphilis (s. u.). Man vergleiche auch eine Abbildung aus dem Schorfe des Oberlippenschankers (Fig. 17, Taf. II) sowie die Abbildungen (Fig. 25 und 26) aus Schnitten einer primär syphilitisch infizierten Drüse u. a. Besonders reichlich fand ich sie kürzlich in einem 6 Wochen alten Schanker des inneren Vorhautblattes (s. Taf. VI, Fig. 51). Ihre Verteilung läßt sich sehr schön durch die unten angegebene Doppelfärbung studieren.

Zuweilen sieht man die großen Kapseln, welche also auch hier meistens kleiner sind, als bei Krebs und Sarkom, schon bei schwacher Vergrößerung. Im allgemeinen ist stärkere Vergrösserung, gute Durchleuchtung (event. künstliche Beleuchtung) und Benutzung der Abbeschen Linse unerläßlich. Sie liegen auch hier zuweilen im tieferen Gewebe in buchtigen Nesträumen, ähnlich denen, welche ich beim Carcinom beschrieben habe. Nur sind diese hier schmäler und regelmäßig noch mit zahlreichen feinen Körnchen und jungen Organismen gefüllt. Von diesen Räumen gebe ich Abbildungen auf Taf. III, Fig. 21 u. 22. Außerdem fand ich aber große Kapseln in verschiedenen Stadien der Entwickelung oder auch leer fest eingepackt in rundlichen oder birnförmigen Herden narbigen Bindegewebes. Von diesem Sachverhalt habe ich mich an in verschiedenster Art behandelten Schnitten sicher überzeugen können. Das ist relativ leicht da, wo ganze Kapseln in verschiedener Größe resp. Kleinheit und junge Organismen darin eingeschlossen sind. Schwieriger ist es bei anderen. Ich fand in

1) Wie aus meinem Buche „Die Parasiten im Krebs und Sarkom des Menschen" (Jena [G. Fischer] 1901) bekannt ist, ist dies eine typische Erscheinung des Carcinoms und führt dort häufiger zur Bildung der sogenannten Epithelperlen, ist dafür jedenfalls der erste Anlaß. Bei Syphilis habe ich diesen ähnliche Veränderungen im Gewebe nicht beobachtet. Es bleibt nur bei kleinen intracellulären, meist runden Kapseln, in welchen allerdings zuweilen nicht nur Körner (Sporen), sondern auch neugebildete junge Organismen beobachtet werden können. Ich sah sie zu 4—6 Exemplaren.

einigen dieser birnenförmigen Körper dreieckige Gebilde parallel so aneinander geschichtet, daß immer abwechselnd das spitze Ende des einen und das breite des folgenden nach einer Seite gerichtet war. An gefärbten Präparaten sind diese Partieen ebenso wie die eingepackten Kapseln anders gefärbt als die Zellen, an aufgehellten Präparaten schimmern sie in gleicher Farbe und gleichem Glanze durch wie dieselben. Aber ich habe außerdem an aufgehellten Präparaten diese Gebilde zerrissen und auf die Weise festgestellt, daß sie nichts anderes waren, als blasse leere Hüllen kleiner und großer Kapseln, die, dicht aufeinander geschichtet, in diesen birnenförmigen Bindegewebsknötchen zusammengepreßt waren. Auch von diesen Herden gebe ich einige Abbildungen (Taf. III Fig. 23 a, b, c). Es läßt sich vermuten, daß dies ursprünglich mit Parasiten in verschiedenen Entwickelungsstadien gefüllte Gänge und Räume des Bindegewebes (im Querschnitt) sind, welche später durch narbiges Bindegewebe erfüllt und so wohl verödet werden, wobei die Parasiten wenigstens zum Teil zu Grunde gehen. Man vergleiche übrigens unten die Ergebnisse der Untersuchung der zur Kultur benützten Initialsklerosen. Es kann dies als eine reaktive Einwirkung des Gewebes aufgefaßt werden, welche vielleicht die konstatierte Rückbildung der Initialsklerose einleitet. Aber es wird nach meinen Abbildungen auch erklärlich, daß ebenso einzelne Parasiten gelegentlich wieder zu einer neuen Entwickelung kommen können.

Stets finden sich in dem die schmalen oder breiteren Gänge umgebenden Bindegewebe zahlreiche junge Organismen, und zwar häufig in Doppelformen, ähnlich wie ich sie bei den Kulturen genauer beschreiben werde (s. Fig. 19, 20).

Für die Aufhellung ungefärbter Schnitte, sowie für die Färbungen werde ich unten das Nötige angeben. Zweckmäßig prüft man stets mehrere Methoden, kontrolliert die eine durch die andere. Frisch untersucht, lassen sich nach den verschiedenen Einwirkungen die Parasiten und Zellen sehr gut unterscheiden. Besonders in mit konzentrierter wässeriger Lösung von Ammonium muriaticum behandelten Schnittpräparaten treten die jungen Organismen schon durch ihren hellen Glanz aus den übrigen Geweben hervor. Sie sind durchschnittlich heller und, so viel ich bis jetzt sehen konnte, keineswegs von solcher Anziehungskraft für das Pigment, wie die jungen Organismen, die ich im Carcinom und Sarkom des Menschen festgestellt habe. Sie erscheinen gewöhnlich hellgrünlichgelb, etwa in der Art eines hellen Citronengelb. Die Form ist entweder rund oder oval oder auch birnenförmig, vielleicht je nach den verschiedenen physikalischen Verhältnissen, unter denen sie sich in den Geweben oder in den Zellen befinden. Bei feiner Einstellung bemerkt man ganz deutlich eine Art Körnung, leichte Erhöhungen oder Unebenheiten auf der Oberfläche und eine doppelte Konturierung des Randsaumes der dünnen Hülle. Die Größe ist wechselnd je nach dem Grade der Entwickelung; manche sind erheblich größer als die Zellkerne, größer selbst als die Zellen, und am ungefärbten Präparate leicht von ihnen zu unterscheiden, andere sind kleiner. In frischen Sklerosen trifft man nur selten solche Abweichungen von dem typischen Bau der jungen Organismen, welche ich in meinem Buche über „die Parasiten im Krebs und Sarkom des Menschen“ als Degenerations- und Absterbeerscheinungen beschrieben habe, Aufquellung des doppelkonturierten Randsaumes, Verwischung der Körnung und radiären Streifung, glasige Verquellung des Protoplasmas

(S. l. c. Fig. 7, s. a. Fig. 33 *d'*). Wohl aber begegnet man ihnen gelegentlich bei alten ulcerierten Fällen. Außerdem finden sich regelmäßig noch viel kleinere längliche oder runde, ebenso glänzende Körnchen im Gewebe verstreut, auch in und neben den Gängen und Räumen. Da ich sehr oft große Organismen sowie kleine Kapseln mit ihnen gefüllt antraf, solche auch bei den Kulturen sah, so scheinen sie mir nach Analogie der gleichen Beobachtungen beim Krebs einem Vorstadium der jungen Organismen (Sporen?) zu entsprechen. Man sieht dieselben häufig neben jungen Organismen oder auch neben einer großen Kapsel schon da und dort in den obersten Epidermisschichten zwischen und in einzelnen Epithelzellen oder in dem deckenden Schorfe; wo aber Gänge deutlich wahrnehmbar sind, in der Umgebung derselben. Man trifft sie in der Epidermis hin und wieder in kleinen Reihen und in kleinen Herden, bei denen ich wiederholt den Zusammenhang mit der Oberfläche nachweisen konnte (s. Abbildung. Taf. I). Im Bindegewebe sitzen die jungen Organismen, wie bemerkt, nicht bloß in den Bindegewebssaftgängen und zwischen den Zellen, sondern zweifellos auch da und dort im Protoplasma der Zellen.

Auch in dem erwähnten Falle von Primärinduration an der Oberlippe konnte ich in dem entzündlich indurierten Bindegewebe zwischen der Lippenmuskulatur, sowie im entzündlich infiltrierten Fettgewebe da und dort, aber im ganzen kleinere Herde von Parasiten durch meine verschiedenen Untersuchungsmethoden nachweisen. Besonders schön ist auch hier an Flächenschnitten parallel zum freien Lippensaume die enge Beziehung einzelner noch kleiner Entzündungsherde des Bindegewebes zu Parasitengängen oder mit Parasiten gefüllten Hohlräumen zu erkennen. Indem letztere mehrfach im Querschnitt getroffen sind, sieht man im inneren Raume die Parasiten und die diesen kleinen Raum kreisförmig umgebende, entzündliche Infiltration. Dieses Bindegewebe und auch das übrige noch nicht kleinzellig infiltrierte, aber, wie leicht zu sehen, doch nicht mehr ganz normale Gewebe der Nachbarschaft ist von einzelnen jungen Organismen durchsetzt.

Daß die starke Bindegewebsinfiltration und Induration auf die Wandungen der Blut- und Lymphgefäße im Bereiche der syphilitischen Initialklerose übergreift und diese zuweilen bis fast zum Verschwinden des Lumens verbreitert, ist bekannt. Nicht bekannt ist dagegen, daß auch gerade innerhalb der verdickten Gefäßwandungen vielfach junge Parasiten im ungefärbten Schnitt gefunden werden können. Diese Wahrnehmungen konnten von mir auch wiederholt an verschiedenen gefärbten Schnitten gemacht werden.

Früher war ich der Meinung, daß zur Deutlichmachung der geschilderten Gangbildungen wie der Parasiten in der primären Induration die der Oelaufhellung vorausgehende Jod-Jodkalibehandlung der Präparate besonders nützlich sei. Ich gewann damit einige sehr schöne Präparate, will aber hier betonen, daß das Verfahren keineswegs notwendig ist, im Gegenteil den Nachteil hat, daß es oft mit Gerinnselbildungen im Präparate verknüpft ist, welche die Uebersicht erschweren und außerdem häufig die Kapseln aus dem Gewebe herausfallen läßt, infolgedessen sie sich bei den weiteren Prozeduren leicht verlieren, was ja zur Klarstellung des thatsächlichen Sachverhaltes auch nicht dienlich ist. Einfache Oelaufhellung nach vorheriger Entwässerung durch absoluten Alkohol giebt bei frischer Untersuchung ausreichend gute klare Bilder, welche gelegentlich auch in Xylolbalsam eingeschlossen dauernd er-

halten bleiben. Freilich verlieren dabei mit der Zeit die eingeschlossenen Parasiten an Schärfe und Deutlichkeit. Nach meinen neueren Untersuchungen empfiehlt es sich, besonders gut entwässertes Citronenöl oder auch Lavendelöl, von dessen Reinheit und Güte man sich vorher überzeugt, aufzutropfen. Citronenöl besonders deshalb, weil es die Gewebszellen noch relativ klar erkennen läßt. Auch mit Hämatoxylin oder Karminalaun schwach gefärbte Präparate lassen die Gänge zuweilen noch ganz gut erkennen. Seltener läßt sich das bei den verschiedenen Färbungen, die ich unten mitteile, erreichen. Außerdem kann man aber auch ganz vorzüglich besonders die jungen Organismen am ungefärbten Präparate durch verschiedene wässerige Salzlösungen darstellen, eine Methode, welche ich neuerdings ganz besonders bevorzuge. Ich erwähne hier nur kurz beispielsweise die Behandlung der Schnitte in 50-proz. wässeriger Lösung von Kali aceticum, oder in 5-proz. oder stärkerer wässeriger Lösung von Ammonium muriaticum. Besonders bei letzterem sind nicht bloß die Parasiten, sondern auch die Gewebselemente in geradezu wundervoller Klarheit und Deutlichkeit nebeneinander zu erkennen. Wiederholtes Anfeuchten mit der Lösung stellt diese immer wieder her. Aber man kann auch nach momentaner Einwirkung eines Tropfens verdünnter Salzsäure solche Präparate später in Glycerin legen und auch dann noch die Verhältnisse gut sehen. Jedoch ist es nicht immer möglich, die Präparate für längere Zeit aufgehoben in gleicher Klarheit zu erhalten, indem sich dann die Lichtbrechungs-, Farbe- und Formunterschiede mehr ausgleichen, verwischen. Aehnlich läßt sich 5-proz. Lösung von Rhodankalium event. mit nachfolgender vorsichtiger Säurebehandlung oder auch das Flemming'sche Säuregemisch verwenden.

Eine einheitliche Färbung der Parasiten bei Syphilis erscheint mir noch schwieriger wie bei Carcinom und Sarkom. Auch haben manche Farbenmischungen abweichende Ergebnisse. So werden z. B. bei der Thioninfärbung die jungen Organismen zwar auch gefärbt, aber die Farbe ist bei den verschiedenen zur Differenzierung verwendeten Säuren oder Salzlösungen kein solches Violettrot wie bei Carcinom und Sarkom, sondern gewöhnlich mehr ein schmutziges Rötlichbraun, welches oft nachher noch einen schmutziggrünen Ton annimmt. Seltener gelingt überdies eine gleichmäßige Färbung der jungen Parasiten. Die großen Kapseln sind bei mit Thionin gefärbten Parasiten entweder grün, besonders bei den freiliegenden, oder braunviolett, so besonders bei den in die Gewebe eingepackten. Bei der Behandlung der Schnitte mit Jod-Jodkali ist das Protoplasma der großen Kapseln goldbraun gefärbt, ebenso erscheinen die jungen Organismen, nur viel heller, aber meist nicht deutlich, noch auch gleichmäßig hervorgehoben. In frühen Stadien können die jungen Organismen nach Gram gefärbt werden, was bei den jungen Organismen in Krebs und Sarkom mir niemals gelang. Doch gelingt es auch bei Syphilisparasiten zumal in den späteren Stadien oft unvollkommen oder nicht. Bei nachfolgender Behandlung mit sehr schwacher Oxalsäurelösung oder mit Pikrinsäure gab mir Loeffler's Methylenblau zuweilen gute Färbung der jungen Organismen.

(Fortsetzung folgt.)

Ueber den Alexingehalt normaler und pathologischer menschlicher Blutsera.

[Aus der Kgl. chirurgischen Universitätsklinik (Prof. v. Angerer) in München.]

Von Dr. **Richard Trommsdorff,** Assistent für Mikroskopie.

Bei der außerordentlichen Bedeutung der Alexine für den Organismus und mit Rücksicht auf die bisher nur spärlichen Veröffentlichungen über diese Stoffe beim Menschen dürfte es gerechtfertigt sein, wenn im Folgenden über einige diesbezügliche Untersuchungen beim Menschen berichtet wird.

Die Möglichkeit hierzu bot sich gelegentlich bakterioskopischer Blutuntersuchungen bei septisch erkrankten Personen, bei denen sich leicht einige Kubikcentimeter Blut mehr, als für die bakteriologische Untersuchung nötig waren, entnehmen ließen, ohne die betreffenden Patienten durch die Blutentziehung irgendwie zu beeinflussen.

Außerdem fanden sich gelegentlich einige sonst gesunde, nur mit leichten äußeren Verletzungen behaftete Personen bereit, sich die für derartige Untersuchungen nötige Menge Blut entnehmen zu lassen, so daß den bei den septischen Patienten erhaltenen Resultaten analog gewonnene von normalen Personen gegenübergestellt werden konnten.

Die Untersuchung gerade septischer Fälle war insofern für derartige Untersuchungen besonders-wichtig, als wir ja wissen, welche bedeutende Rolle den Alexinen (Buchner, Ehrlich's Komplemente) bei dem Kampf des Organismus gegen die Mikroorganismen zukommt, resp. daß die Widerstandsfähigkeit gegen bakterielle Infektionen hauptsächlich durch das Vorhandensein der Alexine bedingt ist und den Phagocyten (Metschnikoff) nur eine sekundäre Rolle bei diesem Kampfe zukommt, wie das aus den neueren Arbeiten auf diesem Gebiet (Ehrlich, Wassermann, Radziewski, Wechsberg, Schütze und Scheller, v. Dungern u. A.) deutlich hervorgeht.

Es war deshalb sehr interessant, ob bei solch septisch Erkrankten etwa ein Mangel an Alexin nachweisbar war, oder vielleicht nur bei sehr schweren prognostisch ungünstigen Fällen, so daß eventuell auch aus dem Alexingehalt des Blutes Rückschlüsse in praktischer Beziehung hätten gezogen werden können.

Es mögen nun die Ergebnisse meiner Untersuchungen folgen, und werde ich im Anschluß an die aus denselben zu ziehenden Schlußfolgerungen auf die Ergebnisse anderer Autoren, soweit solche sich in der Litteratur finden, zurückkommen.

An dieser Stelle möge es mir noch gestattet sein, meinem hochverehrten Chef, Herrn Prof. v. Angerer, für die gütige Erlaubnis zur Anstellung der Versuche meinen ergebensten Dank auszusprechen.

Die Technik der Versuche anlangend, möge folgendes bemerkt sein: Das Blut wurde bei den betreffenden Patienten ausnahmslos aus der Vena mediana, nach vorausgegangener sorgfältiger Desinfektion, mittels ausgekochter, mit steriler physiologischer NaCl-Lösung gespülter Spritze (mit ziemlich weiter Nadel und Zwischenschlauchstück) entnommen, nachdem vorher, durch Anlegen einer Gummibinde oberhalb, Stauung hervorgerufen war.

Häufig, namentlich bei weiblichen Personen, ist es außerordentlich schwer, durch Venaepunktion, wegen der Zartheit der Gefäße, überhaupt Blut zu erhalten, resp. erhält man unter Umständen nur sehr geringe Mengen.

Das gewonnene Blut wurde in sterilem Cylinder aufgefangen, nach ca. $^1/_2$ Stunde nach der Gerinnung, vom Glase gelöst und bis zum nächsten Tag im Eisschrank aufbewahrt. Dann wurde das erhaltene Serum abgehoben, wenn nötig centrifugiert und danach verarbeitet.

Zur Prüfung auf Alexine wurde, soweit genügende Mengen Serum vorhanden waren, die baktercide und globulicide Kraft geprüft, im anderen Falle nur die eine der beiden.

Für die baktericiden Versuche wurden, als praktisch naheliegend, Staphylokokken zur Aussaat verwendet, die durch das Menschenserum überhaupt nur gering abgetötet werden, außerdem gelegentlich noch daneben Bact. typhi und coli comm. als leicht abzutötende Arten.

Der bei den hier mitgeteilten Fällen verwendete Staphylococcus aureus war jedesmal derselbe, einige Monate bereits im Laboratorium gezüchtete Stamm.

Für die hämolytischen Versuche diente jedesmal frisch entnommenes Meerschweinchenblut in 5-proz. Aufschwemmung, und zwar wurden zu jedesmal 2 ccm dieser wechselnde Mengen Serum zugesetzt, auf gleiche Volumina mit physiologischer NaCl-Lösung aufgefüllt und bei 37° beobachtet (bis 2 Stunden; dann bis 24 Stunden im Eisschrank).

In den folgenden Versuchsprotokollen wurde bei den hämolytischen Versuchen das Resultat der mit inaktiven Seris angesetzten Kontrollröhrchen stets fortgelassen, da in diesen nie Lösung eintrat.

Betreffs der baktericiden Kraft des Menschenserums ist zu bemerken, daß man zu unterscheiden hat, ebenso wie bei anderen Seris, zwischen Abtötung und Entwickelungshemmung der zum Versuch verwendeten Bakterien; es sind deshalb in den Versuchen mit Staphylokokken, in denen stets nur Entwickelungshemmung zu beobachten war, die Röhrchen mit inaktivem Serum ($^1/_2$ Stunde auf 56° erhitztem) von Wichtigkeit.

A. Normale Fälle.

I. Hämolytische und baktericide Kraft geprüft.

Tabelle I.

Staphylococcus.

Inhalt der Röhrchen	Kolonieenzahl			
	Aussaat	$2^1/_2$ Stunden	5 Stunden	24 Stunden
1) 2 ccm aktives Serum	3600	3500	3 000	sehr viele
2) 2 „ inaktives „	3300	7000	14 000	„ „

2 ccm 5-proz. Meerschweinchenblut werden gelöst durch:

1,0 ccm Serum	—
0,5 „ „	10 Minuten vollständig
0,25 „ „	$^1/_2$ Stunde ca. $^3/_4$; 24 Stunden unvollständig
0,1 „ „	24 Stunden Spur

Tabelle II.
Staphylococcus.

Inhalt der Röhrchen	Kolonieenzahl		
	Aussaat	3 Stunden	6 Stunden
1) 2 ccm aktives Serum	1500	ca. 40 000	verflüssigt
2) 2 „ inaktives „	1500	ca. 100 000	„
Bact. coli.			
1) 2 ccm aktives Serum	1150	1350	0
2) 2 „ „ „	1850	1500	0
3) 2 „ Bouillon	1200	über 100 000	sehr viele

2 ccm 5-proz. Meerschweinchenblut werden gelöst durch:

1,0 ccm Serum	—
0,5 „ „	—
0,25 „ „	24 Stunden Spur
0,1 „ „	24 „ Spurchen

Tabelle III.
Staphylococcus.

Inhalt der Röhrchen	Kolonieenzahl			
	Aussaat	$2^1/_2$ Stunden	5 Stunden	24 Stunden
1) 2 ccm aktives Serum	4600	3900	5 700	sehr viele
2) 2 „ inaktives „	3200	7000	15 000	„ „

2 ccm 5-proz. Meerschweinchenblut werden gelöst durch:

1,0 ccm Serum	—
0,5 „ „	5 Minuten vollständig
0,25 „ „	$^3/_4$ Stunden fast fertig; 24 Stunden unvollständig
0,1 „ „	24 „ geringe Lösung; Kuppe

Tabelle IV.
Staphylococcus.

Inhalt der Röhrchen	Kolonieenzahl			
	Aussaat	$2^1/_2$ Stunden	5 Stunden	24 Stunden
1) 2 ccm aktives Serum	8300	4500	24 000	sehr viele
2) 2 „ inaktives „	3300	6700	16 000	„ „

2 ccm 5-proz. Meerschweinchenblut werden gelöst durch:

1,0 ccm Serum	—
0,5 „ „	24 Stunden Spur
0,25 „ „	24 „ „
0,1 „ „	24 „ „

Tabelle V.
Staphylococcus.

Inhalt der Röhrchen	Kolonieenzahl		
	Aussaat	$6^1/_2$ Stunden	24 Stunden
1) 2 ccm aktives Serum	260	13 000	sehr viele
2) 2 „ „ „	600	12 500	„ „
3) 2 „ „ „	1900	20 500	„ „
4) 2 „ „ „	3500	22 500	„ „
5) 2 „ „ „	8200	23 500	„ „
6) 2 „ inaktives „	200	40 000	„ „

2 ccm 5-proz. Meerschweinchenblut werden gelöst durch:

1,0 ccm Serum	3 Minuten vollständig
0,5 „ „	6 „ „
0,25 „ „	10 „ „
0,1 „ „	15 „ „

II. Ausschließlich die hämolytische Kraft geprüft.

Tabelle VI—XIII.

No.	2 ccm 5-proz. Meerschweinchenblut werden gelöst durch:			
	1 ccm Serum	0,5 ccm Serum	0,25 ccm Serum	0,1 ccm Serum
VI	3 Min. fertig	6 Min. fertig	24 Stdn. ziemlich vollständig	24 Stdn. ca. 1/2 gelöst
VII	4 „ „	7 „ „	1 Std. fast fertig 24 Stdn. unvollständig	10 Min. Spur 24 Stdn. „
VIII	8 „ „	1 Std. ca. 3/4 gelöst 24 Stdn. unvollständig; Küppchen	24 Stdn. Spur	24 „ „
IX	8 „ „	1 Std. ca. 3/4 gelöst 24 Stdn. unvollständig	24 „ „	24 „ „
X	—	—	24 „ „	24 „ „
XI	2 Stdn. ca. 3/4	24 „ Spur	24 „ „	24 „ θ
XII	2 „ „ 1/2	24 „ wenig	24 „ „	24 „ θ
XIII	24 „ wenig	24 Stdn. Spur	24 „ „	24 „ θ

Wir sehen demnach bei 13 Fällen, in denen bei sonst gesunden kräftigen Personen die hämolytische Kraft des Blutserums bestimmt wurde, dieselbe in 1 Fall stark (V),
„ 6 Fällen mittelstark (I, III, VI, VII, VIII, IX) und
„ 6 „ schwach (II, IV, X, XI, XII, XIII)
und die bakterieide Kraft gegenüber Staphylococcen von 5 untersuchten normalen Fällen nur in einer meist mäßig starken Entwickelungshemmung ausgesprochen.

Betrachtet man die Fälle, in denen bactericide und hämolytische Kraft gleichzeitig bestimmt wurde, ob sich hier eine annähernde Uebereinstimmung beider zeigt oder nicht, so sieht man, daß das nicht der Fall ist. So ist z. B. in Fall V die hämolytische Kraft sehr stark, die baktericide gegen Staphylokokken, auch bei den zum Teil sehr kleinen Aussaaten, sehr gering. In Fall I und III stehen baktericide und hämolytische Kraft in gleichem Verhältnis (mäßig stark); im Fall II ebenso, nur daß hier beide minimal sind. Im Fall IV überwiegt die baktericide Kraft die hämolytische.

Zu beachten ist dann noch, daß im Fall II (minimale hämolytische Kraft), wo die baktericide Kraft gegen Staphylokokken außerordentlich gering ist, dieselbe gegen Bact. coli noch stark ausgesprochen vorhanden ist.

B. Septische Fälle.

I. Hämolytische und bactericide Kraft geprüft.

Tabelle XIV.

Leberschußverletzung; Pleuritis; Sepsis. In 1 ccm Blut 26 Kolonieen Staphyl. aur., 3 Monate nach der Blutentnahme geheilt entlassen.

Staphylococcus.

Inhalt der Röhrchen	Kolonieenzahl			
	Aussaat	3 Stunden	7 Stunden	24 Stunden
1) 2 ccm aktives Serum	3200	900	1700	verflüssigt
2) 2 „ inaktives „	2900	3200	5600	„

2 ccm 5-proz. Meerschweinchenblut werden gelöst durch:

1,0 ccm Serum	5 Minuten vollständig
0,5 „ „	20 „ fast vollständig; bleibt unvollständig
0,25 „ „	30 „ ca. 1/2; 24 Stunden großer Bodensatz
0,1 „ „	24 Stunden Spur

Tabelle XV.

Mastitis; hohes Fieber; in 1 ccm Blut 15 Kolonieen Staphyl. alb; 13 Tage nach der Blutentnahme geheilt entlassen.

Inhalt der Röhrchen	Kolonieenzahl		
	Aussaat	7 Stunden	24 Stunden
1) 2 ccm aktives Serum	5300	176	4 350
2) 2 „ „ „	9300	216	16 000
3) 2 „ inaktives „	8000	ca. 100 000	sehr viele

2 ccm 5-proz. Meerschweinchenblut werden gelöst durch:

1,0 ccm Serum	5 Minuten vollständig
0,5 „ „	5 „ „
0,25 „ „	5 „ „
0,1 „ „	15 „ unvollständig; bleibt unvollständig

Tabelle XVI.

Komplizierte Unterschenkelfraktur beiderseits; hohes Fieber; in 1 ccm Blut 29 Kolonieen Staphyl. alb.; 6 Monate nach der Blutentnahme entlassen.

Staphylococcus.

Inhalt der Röhrchen	Kolonieenzahl			
	Aussaat	3 Stunden	6 Stunden	24 Stunden
1) 2 ccm aktives Serum	6 300	6 700	19 800	ca. 100 000
2) 2 „ inaktives „	6 700	7 000	30 000	ca. 100 000
Bact. typhi.				
1) 2 ccm aktives Serum	10 000	θ	θ	θ [1]
2) 2 „ inaktives „	10 000	10 000	ca. 70 000	über 100 000

2 ccm 5-proz. Meerschweinchenblut werden gelöst durch

1,0 ccm Serum	5 Minuten vollständig
0,5 „ „	—
0,25 „ „	30 „ „
0,1 „ „	30 „ ca. 1/2; 24 Stunden unvollständig

1) Vollständige Abtötung (Bouillonkontrolle).

Tabelle XVII.

Komplizierte Unterschenkelfraktur; hohes Fieber; in 1 ccm Blut 22 Kolonieen Staphyl. alb.

Staphylococcus.

Inhalt der Röhrchen	Kolonieenzahl		
	Aussaat	5 Stunden	24 Stunden
1) 2 ccm aktives Serum	6 500	7 000	32 000
2) 2 „ inaktives „	5 300	93 000	sehr viele

2 ccm 5-proz. Meerschweinchenblut werden gelöst durch

1,0 ccm Serum	15 Minuten Spur	24 Stunden desgl. (für die ersten drei)
0,5 „ „	desgl.	
0,25 „ „	desgl.	
0,1 „ „	θ	

Tabelle XVIII.

Derselbe Fall wie Tab. XVII; Blutentnahme 4 Wochen später; immer noch hohes Fieber; in 1 ccm Blut jetzt 12 Kolonieen Staphyl. alb. Patient 2 Tage nach dieser Blutentnahme †.

Staphylococcus.

Inhalt der Röhrchen	Kolonieenzahl			
	Aussaat	$2^1/_2$ Stunden	5 Stunden	24 Stunden
1) 2 ccm aktives Serum	9 600	12 800	ca. 60 000	ca. 100 000
2) 2 „ inaktives „	10 000	10 000	verflüssigt	über 100 000

Bact. typhi.

Inhalt der Röhrchen	Aussaat	$2^1/_2$ Stunden	5 Stunden	24 Stunden
1) 2 ccm aktives Serum	2 300	3	θ	θ [1]
2) 2 „ inaktives „	3 800	20 700	über 100 000	sehr viele

2 ccm 5-proz. Meerschweinchenblut werden gelöst durch

1,0 ccm Serum	30 Minuten $^1/_2$; 24 Stunden unvollständig; Kuppe
0,5 „ „	30 „ Spur; 24 Stunden desgl.
0,25 „ „	θ
0,1 „ „	—

Tabelle XIX.

Osteomyelitis; hoch fiebernd. In 1 ccm Blut 50 Kolonieen Staphyl. aur.; 3 Wochen nach der Blutentnahme entlassen.

Staphylococcus.

Inhalt der Röhrchen	Kolonieenzahl			
	Aussaat	$2^1/_2$ Stunden	5 Stunden	24 Stunden
1) 2 ccm aktives Serum	1100	100	23	1000
2) 2 „ inaktives „	1200	1200	3000	sehr viele

2 ccm 5-proz. Meerschweinchenblut werden gelöst durch

1,0 ccm Serum	3 Minuten fertig
0,5 „ „	6 „ „
0,25 „ „	10 „ „
0,1 „ „	15 „ „

1) Bouillonkontrolle ergiebt vollständige Abtötung.

Tabelle XX.

Eiterige Kniegelenkentzündung; hohes Fieber; im Blute keine Bakterien nachweisbar. Patient 2 Monate nach der Blutentnahme noch in der Klinik.

Staphylococcus.

Inhalt der Röhrchen	Kolonieenzahl			
	Aussaat	$2^1/_2$ Stunden	5 Stunden	24 Stunden
1) 2 ccm aktives Serum	1200	1700	3000	5 500
2) 2 „ inaktives „	900	1200	2400	25 000

2 ccm 5-proz. Meerschweinchenblut werden gelöst durch

1,0 ccm Serum	$^1/_2$ Std. fast vollständig; 24 Stdn. unvollständig
0,5 „ „	$^1/_2$ „ ca. $^1/_2$; 24 Stunden Küppchen
0,25 „ „	$^1/_2$ „ etwas Lösung; 24 Stunden Kuppe
0,1 „ „	$^1/_2$ „ Spur; 24 Stunden desgl.

Tabelle XXI.

Zungencarcinom; seit einiger Zeit hohes Fieber, Auswurf; im Blute keine Bakterien nachweisbar.

Staphylococcus.

Inhalt der Röhrchen	Kolonieenzahl			
	Aussaat	$2^1/_2$ Stunden	5 Stunden	24 Stunden
1) 2 ccm aktives Serum	400	120	40	36
2) 2 „ „ „	900	400	250	360
3) 2 „ inaktives „	400	1000	50 000	sehr viele

2 ccm Meerschweinchenblut werden gelöst durch:

1,0 ccm Serum	—
0,5 „ „	10 Minuten fertig
0,25 „ „	1 Stunde ca. $^1/_2$; 24 Stunden Kuppe
0,1 „ „	24 Stunden Spur

II. Ausschließlich die hämolytische Kraft geprüft.

Tabelle XXII—XXIV.

	2 ccm 5-proz. Meerschweinchenblut werden gelöst durch:			
	2 ccm Serum	0,5 ccm Serum	0,25 ccm Serum	0,1 ccm Serum
XXII. Diabetes. Gangrän; hohes Fieber; in 1 ccm Blut 72 Kolonieen Strept. long. Pat. 2 Tage nach der Blutentnahme †	5 Minuten vollständig	15 Minuten vollständig	$^1/_2$ Stunde ca. $^1/_2$ gelöst; 24 Stdn. desgl.	24 Stunden Spur
XXIII. Ellbogenverletzung; Phlegmone; Amputation; in 1 ccm Blut 21 Kolon. Staph. alb.; $1^1/_2$ Monate nach der Blutentnahme entlassen	5 Minuten vollständig	20 Minuten vollständig	$^1/_2$ Stunde ca. $^1/_2$ gelöst; 24 Stdn. desgl.; Kuppe	θ
XXIV. Omarthritis; hohes Fieber; im Blute keine Bakterien nachweisbar; 8 Tage nach der Blutentnahme entlassen	—	1 Stunde fast fertig; 24 Stdn. unvollständig	1 Stunde ca. $^1/_2$ gelöst; 24 Stdn. desgl.; Kuppe	1 Stunde etwas Lösung; 24 Stunden desgl.

III. Ausschließlich die bakterizide Kraft geprüft.

Tabelle XXV.

Oberschenkelabsceß; hohes Fieber; im Blute keine Bakterien nachweisbar.

Staphylococcus.

Inhalt der Röhrchen	Kolonieenzahl			
	Aussaat	3 Stunden	6 Stunden	24 Stunden
1) 2 ccm aktives Serum	4500	2900	2100	ca. 80 000
5) 2 „ inaktives „	5000	7000	mehrere 100 000	sehr viele

Von den untersuchten 12 Blutseris bei septischen, stets schwer kranken Personen war demnach die hämolytische Kraft des Serums in den 11 untersuchten Fällen

3mal stark (XV, XVI, XIX),
4mal mittelstark (XIV, XXI, XXII, XXIII) und
4mal schwach (XVII, XVIII, XX, XXIV).

Die bakterizide Kraft war in den 9 untersuchten Fällen gegen Staphylokokken

4mal ziemlich stark (XIV, XV, XIX, XXI),
1mal mittelstark (XVII),
2mal schwach (XX, XXV) und
2mal minimal (XVI, XVIII).

Die auf Hämolyse und Bakteridie (gegen Staphylokokken) gleichzeitig geprüften septischen 8 Fälle hatten das Ergebnis, daß in 4 Fällen die baktericide Kraft annähernd gleich stark oder schwach wie die hämolytische war (XV, XIX, XVIII, XX), in einem Falle (XVI) die hämolytische stark, die baktericide Kraft minimal war, in den 3 übrigen Fällen (XIV, XVII, XXI) die baktericide Kraft die hämolytische bedeutend an Stärke übertraf.

In den 2 Fällen (XVI, XVIII), in denen außer Staphylokokken, gegen welche das Serum minimal wirkte, noch Bact typhi ausgesät wurde, ist wieder die gegen diesen außerordentlich starke baktericide Kraft bemerkenswert. Es ist also ebenso, wie bei den normalen Fällen, zwischen baktericider und hämolytischer Kraft keine Uebereinstimmung zu konstatieren, resp. in ca. 50 Proz. ist solche vorhanden, in ca. 50 Proz. nicht.

Sehen wir nun noch zu, wie sich die Fälle, in denen Bakterien im Blute nachweisbar waren, zu denen, in welchen das nicht der Fall war, verhalten betreffs ihrer baktericiden resp. hämolytischen Kraft. Auch hier können wir in den 12 untersuchten Fällen kein konstantes Verhältnis beobachten.

Die 3 Fälle, in denen sich im Blute keine Bakterien nachweisen lassen (XX, XXI, XXV), weisen ebenso wie die 9 übrigen, in denen sich im Blute Eitererreger fanden, bald starke, bald schwache baktericide resp. hämolytische Wirkung des Blutserums auf.

Endlich mögen noch 2 Tabellen hier Platz finden, die 2 sehr vorgeschrittene Carcinomkranke betreffen; bei dem einen wurde die baktericide, bei dem anderen die hämolytische Kraft des Serums bestimmt.

Tabelle XXVI.

Inhalt der Röhrchen	Kolonieenzahl			
	Aussaat	3 Stunden	6 Stunden	24 Stunden
1) 2 ccm aktives Serum	7500	7 700	133 000	sehr viele
2) 2 „ inaktives „	8000	37 000	sehr viele	sehr viele

Tabelle XXVII.

2 ccm 5-proz. Meerschweinchenserum werden gelöst durch:			
1 ccm Serum	0,5 ccm Serum	0,25 ccm Serum	0,1 ccm Serum
—	—	5 Minuten fertig	10 Minnten fertig

Von den beiden klinisch etwa gleichweit vorgeschrittenen Fällen ist bei dem einen die geprüfte baktericide Wirkung des Serums minimal, bei dem anderen die geprüfte hämolytische Wirkung außerordentlich stark.

Ziehen wir somit das unmittelbare Ergebnis aus den mitgeteilten Versuchen, so können wir sagen, daß — die hämolytische und die baktericide Wirkung des Serums als Maßstab für die jeweils vorhandenen Alexine angenommen —

1) die Alexine beim normalen Menschen in außerordentlich wechselnder Menge — aber stets deutlich nachweisbar — vorhanden sind,
2) daß dasselbe der Fall ist bei septisch schwer erkrankten (und auch bei mit vorgeschrittenem Carcinom behafteten) Personen, und man somit
3) aus dem Gehalte des Blutserums an Alexinen keine unmittelbaren Schlüsse auf vorhandene krankhafte Affektionen, die den Gesamtorganismus und die Widerstandskraft desselben beeinflussen, zu ziehen imstande ist, die Untersuchung des Blutserums auf Alexine mithin bisher nicht als für die Diagnose oder Prognose in Betracht kommende Methode zu bezeichnen ist.

Zu demselben Schlusse gelangen sowohl E. Neisser und H. Döring[1]) wie Kreibisch[2]) bei ihren Untersuchungen über die allein von ihnen geprüfte hämolytische Wirkung des menschlichen Blutserums, Neisser und Döring auf Grund von 20 untersuchten Fällen (Pneumonie, urämisches Coma bei Nephritis, schmerzhafte entzündliche Infiltrationen bei Tuberkulose, Emphysem, luetische Neuralgie), bei denen sie die „hämolytischen Grenzwerte als fast völlig konstante“ fanden, Kreibisch, „weil sich weder qualitativ noch quantitativ regelmäßige Unterschiede zwischen normalem und pathologischem Serum ergaben“. Die von letzterem Autor untersuchten 26 Fälle betrafen Pemphigus, Erysipel, Lues, Combustio, Purpura, staphylogene Pyämie.

Diese für praktische Zwecke negativen Resultate erklären sich, wenn wir einmal die relativ schnelle Regenerierung der Alexine im Organismus in Betracht ziehen, andererseits den damit in Zu-

1) Berl. klin. Wochenschr. 1901. No. 22.
2) Wiener klin. Wochenschr. 1902. No. 27.

sammenhang stehenden Umstand, daß ein dauernder Schwund baktericider Stoffe aus dem Blute immer erst kurze Zeit vor dem Tode einzutreten pflegt.

So konnte Radziewski[1]) eine Steigerung der baktericiden Kraft des Blutserums durch den Einfluß der infizierenden und sich im Organismus vermehrenden Mikroben nachweisen.

Schütze und Scheller[2]) zeigten den völligen Verbrauch und die schnell eintretende Regenerierung der Komplemente bei Einführung von Ziegenblut in Kaninchen. Diese Regeneration wurde allerdings verzögert bezw. aufgehoben, wenn die betreffenden Tiere vorher mit Hogcholera infiziert wurden. Dabei ist aber zu bedenken, daß eben die Tiere derartigen Infektionen sehr rasch erliegen, wir also Verhältnisse haben, bei denen wir auch sonst das Verschwinden der Alexine konstatieren können, d. h. relativ kurze Zeit vor dem Tode.

So zeigte beispielsweise Wilde[3]), daß bei der Milzbrandinfektion beim Kaninchen, erst wenn die Bacillen den ganzen Körper überschwemmen, die baktericiden Stoffe aus dem Blute schwinden; so lange nur relativ wenig Bakterien von den lokalen Herden in das Blut übertreten, werden dieselben durch die sich immer neu bildenden Alexine abgetötet.

Dasselbe Verhalten konnte M. Hahn[4]) bei der Pest beim Menschen konstatieren; auch hier fanden sich im Blute immer nur verhältnismäßig wenig Bacillen, und erst 1—36 Stunden vor dem Tode, wenn die baktericiden Substanzen schwinden, waren im Blute große Mengen Bakterien nachweisbar.

So müssen wir eben auch annehmen, daß bei den anderen beim Menschen vorkommenden Septikämieen, so lange sich nur verhältnismäßig wenig Bakterien im Blute nachweisen lassen, die baktericiden Stoffe immer regeneriert werden, und erst, wenn man kurz vor dem Tode untersuchen würde, würde sich wahrscheinlich auch hier der Schwund der Alexine zeigen.

Daß wir bei Personen mit allgemeinen Kachexieen, wie z. B. Carcinomkranken, durchaus nicht einen Mangel an Alexin finden, stimmt gut mit der Thatsache, daß derartige Kranke durchaus nicht etwa besonders leicht Infektionen, sondern meist nur ihrer Kachexie erliegen. Erst bei wirklichen Aenderungen der Blutbeschaffenheit, wie z. B. beim Diabetes, liegen die Verhältnisse anders.

Die individuell großen Verschiedenheiten im Gehalte des Serums an Alexinen bei gesunden Personen sind in Uebereinstimmung mit der eben individuell großen angeborenen Widerstandsfähigkeit (Resistenz).

All dies schließt aber nicht aus, daß gelegentlich auch durch gewisse Vergiftungen (Phosphor, Ehrlich und Morgenroth[5]) oder andere tiefgreifende Schädigungen (chronische Eiterungen, Metalnikoff[6]), Hunger, Bentivegna und Carini)[7]) der Gehalt an Alexinen herabgesetzt bezw. aufgehoben werden kann.

Wenn wir also im allgemeinen auf die Untersuchung des Blut-

1) Zeitschr. f. Hyg. Bd. XXXVII. 1901. p. 1.
2) Zeitschr. f. Hyg. Bd. XXXVI. p. 270 u. 459.
3) Zeitschr. f. Hyg. Bd. XXXVII. 1901. p. 476.
4) Berl. klin. Wochenschr. 1901. p. 766.
5) Berl. klin. Wochenschr. 1901. No. 31.
6) Annal. de l'Inst. Pasteur. T. XIV. 1901. p. 580.
7) Lo Sperimentale. 1900. Fasc. 5. p. 490.

serums auf Alexine für die Praxis, etwa in prognostischer Beziehung, keine großen Hoffnungen setzen dürfen, so möge doch noch darauf hingewiesen werden, daß eventuell gewisse Unregelmäßigkeiten der Resultate auf Kosten bestimmter, der Untersuchungsmethode anhaftender Fehler zu setzen sein könnten.

So verfüge ich beispielsweise über Protokolle, wo ein und dasselbe Menschenserum am 1. Tage stark hämolytisch für eine bestimmte Blutart war, am nächsten Tage nach 17-stündiger Aufbewahrung im Eisschranke diese hämolytische Wirkung fast völlig verloren hatte, und ähnliche Erfahrungen veröffentlichen z. B. Morgenroth und Sachs[1]). Es wäre also bei künftigen Untersuchungen eine möglichste Gleichmäßigkeit sämtlicher Versuchsbedingungen anzustreben, also eine thunlichst sofort nach der Blutentnahme anzustellende Prüfung (eventuell mit von defibriniertem Blute abcentrifugiertem Plasma) an, auch für hämolytische Versuche, wenn möglich gleichen Reaktionsobjekten (also jedesmal Blutkörperchen ein und desselben Tieres, am besten Kaninchen) u. s. w.

Endlich möge noch betreffs der Unterschiede in der hämolytischen und baktericiden Wirkung der Seris in obigen Versuchen darauf hingewiesen werden, daß dieselben eine Mehrheit der Alexine im Sinne Ehrlich's durchaus nicht beweisen, vielmehr durch die Argumente der Buchner'schen Schule vollauf erklärt werden, daß die Alexine gegenüber den verschiedenen biologischen Reagentien, wie sie Bakterien und Erythrocyten resp. verschiedene Arten solcher darstellen, verschieden stark wirken.

Die Leukocyten als Komplementbildner bei der Cholerainfektion.

[Aus dem hygienischen Institute der Universität Königsberg i. Pr. (Direktor: Prof. Dr. R. Pfeiffer).]

Von Dr. **L. Ascher,** Kreisassistenzarzt in Königsberg i. Pr.

Die Bedeutung der Leukocyten für die Abwehr infektiöser Krankheiten hat schon eine ganze Litteratur gezeitigt; auf diese einzugehen, können wir uns aber an dieser Stelle um so eher versagen, als sowohl Moxter (1899) (1), wie auch Gengou (1901) (2), namentlich aber Metschnikoff in seinem neuesten Buche (3) dieselbe historisch-kritisch eingehend besprochen haben. Nur sei für die folgenden Auseinandersetzungen bemerkt, daß, während Buchner (4) unter Alexinen die bakterientötende Eigenschaft gewisser im Blute cirkulierender Eiweißstoffe verstand und Metschnikoff zuerst als Ursprungsstätte derselben die Phagocyten ansah, letzterer in seinem neuesten Buche, entsprechend der heutigen Kenntnis von den komplizierteren Eigenschaften des Immunserums, seine Ansicht folgendermaßen modifiziert hat: Der Fixator (Amboceptor, Immunkörper, der thermostabile Bestandteil des Immunserums) cirkuliert im Plasma, die Cytase dagegen (Komplement, der thermolabile Teil) bleibt in den Phagocyten und entweicht nur wäh-

1) Berl. klin. Wochenschr. 1902. No. 27. p. 633.

rend der Phagolyse oder beim Koagulieren des Blutes, d. h. nach der Entnahme (p. 109). Daß der Immunkörper irgend etwas mit den Leukocyten zu thun habe, ließ sich wohl nach den Experimenten von Pfeiffer und Marx (5) (für Cholera) und der Bestätigung ihrer Ergebnisse für Typhus durch Deutsch (6) und Wassermann (7) nicht mehr aufrecht erhalten, so daß der Streit über diesen Punkt der Geschichte angehört; wohl aber verdient die noch restierende Bedeutung der Phagocyten, wie sie Metschnikoff eben formuliert, eine genauere Würdigung. Wir wollen uns allerdings lediglich auf die Cholerainfektion, der bisher am genauesten erforschten, beschränken.

M. stützt seine Ansicht darauf, daß erstens weder im Unterhautzellgewebe, noch im Oedem, noch im Humor aquaeus, d. h. da, wo es keine Leukocyten gäbe, das Pfeiffer'sche Phänomen, d. h. die extracelluläre Auflösung der Bakterien zustande käme. Zweitens soll sie fehlen, wenn man durch eine 24 Stunden vor der Einführung der Bakterien erfolgte Injektion von physiologischer Kochsalzlösung, Bouillon etc. die Phagocyten vor der Phagolyse bewahrt. Drittens, und das dürfte wohl als experimentum crucis angesehen werden, soll eine Ansammlung von Leukocyten, sobald man sie in geeigneter Weise abgetötet und dadurch die Cytase, das Komplement freigemacht hat, eine größere Menge Komplemente enthalten als das Serum des betreffenden Tieres.

I. Die extracelluläre Auflösung soll weder im Humor aqueus, noch im Oedem, noch im Unterhautzellgewebe zustande kommen.

Nun giebt aber M. in einer Anmerkung zu p. 203 selbst zu, daß eine gewisse Zahl von Bakterien doch im Humor aqueus aufgelöst wird. Das genügt, um zu beweisen, daß an einer leukocytenfreien Stelle Komplemente vorhanden sein können; daß sie dort in großer Menge vorhanden sein sollten, kann bei den eigenartigen Cirkulationsverhältnissen, ein Punkt, mit dem wir uns noch einmal beschäftigen werden, von vornherein gar nicht angenommen werden. Ein Experimentieren an der vorderen Augenkammer verbot sich aber aus dem Grunde, daß nur geringe Reizungen an dieser Stelle genügen, um eine große Menge Leukocyten anzulocken, dem Experiment also alle Beweiskraft zu nehmen. Man war deshalb auf die Mischung von Amboceptor und Komplement in vitro angewiesen; nun ergaben aber Experimente, die ich in der Zahl von fast 100 mit Kombinationen verschiedenster Tiersera vornahm, daß beim Vorhandensein nur geringer Komplementmenge trotz ausreichendem Amboceptorengehalte die Auflösung in vitro höchst unsichere Resultate ergiebt, selbst wenn man von jeder Probe Stellen untersucht, und zwar nicht nur im hängenden Tropfen, sondern auch im gefärbten Präparate.

Dagegen ergaben die Einspritzungen unter die Haut, wie schon Pfeiffer gezeigt hatte (8), und in Oedem das Vorhandensein von freiliegenden Granulis, allerdings zu einer Zeit, wo auch Leukocyten, wenn auch höchst spärlich, an die Injektionsstelle gekommen waren. Die Versuche wurden in verschiedenen Modifikationen vorgenommen. Es wurden sowohl immunisierte Tiere (Meerschweinchen) gewählt, denen nur Cholerabacillen in Bouillon oder physiologischer Kochsalzlösung, als auch normale Tiere, denen ein Gemisch von Bakterienimmunserumbouillon injiziert wurde. Um dem Einwande zu begegnen, daß beim Herausziehen des Exsudates mittels Kapillaren einige Hämorrhagieen zustande

gekommen seien, wodurch etwas Cytase frei wurde (Metschnikoff's l'Immunité. p. 232), wurden verschiedene Modifikationen angewendet; entweder wurde mit ganz feiner, spitzer Nadel die Einspritzung gemacht, oder es wurde durch einen Scherenschlag die Oberhaut durchtrennt und dann mit einer stumpfen Kanüle unter Vermeidung jeglicher (auch mikroskopisch) bemerbarer Blutung die Einspritzung vorgenommen; die Entnahme eines zu untersuchenden Tropfens geschah entweder durch Einführung feinster Glaskapillaren in die Injektionsstelle oder durch sanftes Herausdrücken eines Tropfens ohne Einführung eines Instrumentes. Es wurden 9 Versuche unter die normale Haut und 4 in einen durch Umschnürung ödematös gemachten Schenkel (ebenfalls subkutan) gemacht, und zwar sowohl bei normalen wie bei immunisierten Tieren. Da die Versuche untereinander übereinstimmen, so seien nur die folgenden angeführt.

Normales Meerschweinchen; ein Schenkel mit einem Gummischlauche fest umschnürt; die Injektionen wurden erst gemacht, als Oedem eingetreten war.

a) Umschnürtes Bein. Injektion 12 Uhr 38 Minuten.

12 Uhr 43 Min. (5 Min.) viele Bacillen.

1 Uhr 5 Min. (27 Min.) meist Bacillen, einzelne Granula.

5 Uhr ($4^1/_2$ Stunden) Bacillen, zum Teil gequollen, einzelne Granula freiliegend.

b) Normales Bein. Injektion 12 Uhr 38 Min.

12 Uhr 43 Min. (5 Min.) viele Bacillen, ganz vereinzelt freiliegende Granula.

1 Uhr 5 Min. (27 Min.) einzelne Bacillen, sehr viele freiliegende Granula.

1 Uhr 45 Min. (1 Std. 7 Min.) fast nur Granula, freiliegend, ganz vereinzelt ein Bacillus.

5 Uhr ($4^1/_2$ Stunden) Granula und Bacillen, freiliegend.

Trotz mehrfach tödlicher Dosis blieben alle Versuchstiere am Leben; jedoch konnte man noch am anderen Tage in der Umgebung der Einspritzungsstelle einen vereinzelten freiliegenden Bacillus finden. Von einer Phagocytose war kaum etwas zu bemerken; die Auflösung erfolgte stets im wesentlichen extracellulär, selbst wenn im Verlaufe des Experimentes sich vereinzelte Leukocyten einstellten. Man ersieht aus diesen Zeitangaben, daß sich das Pfeiffer'sche Experiment schon im Unterhautzellgewebe, noch mehr aber im ödematösen Gewebe, wesentlich langsamer abspielt, als im Peritoneum, wo die Hauptmasse der Bacillen zwischen 30 und 40 Minuten in Granula umgewandelt zu sein pflegt, und wo nach einer Stunde sowol Bakterien wie Granula aus der Bauchhöhle verschwunden sind. Man ersieht daraus, daß es die Cirkulation ist, welche die Komplemente verteilt, und daß die Sättigung der Bakterien mit Komplementen um so früher und um so intensiver erfolgt, je reger der Kreislauf des Blutes ist. Dementsprechend finden wir im Humor aqueus äußerst wenige, im Oedem ganz geringfügige, in der Haut etwas reichlichere Mengen von Komplementen, dagegen sehr viel mehr im Peritoneum. Den Vergleich weiter noch auf das cirulierende Blut auszudehnen, geht nicht an, weil dabei noch ein anderes Moment hinzukommt, die Verteilung der Bakterien auf eine sehr viel größere Fläche.

II. Die extracelluläre Auflösung der Bakterien soll nicht erfolgen, wenn man durch 24 Stunden vorher erfolgte Einspritzung von frischer Bouillon die Phagocyten vor der Phagolyse bewahrt.

Zwei Reihen von Versuchen kommen hier in Betracht: die Auflösung in der Blutbahn und die in der Bauchhöhle. Für die erstere Reihe wählte ich als Versuchstier das Kaninchen, da hier die Technik durch die Benutzung der Ohrvenen als Einspritzungsstelle leichter und weniger eingreifend ist als beim Meerschweinchen, bei dem man die Jugularis benutzen muß. Es wurde durch eine Ohrvene warme frische Bouillon injiziert und 24 Stunden darauf durch eine Vene des anderen Ohres vorsichtig entweder — beim immunisierten Kaninchen — $^1/_2$ ccm warmer Bouillon eingespritzt, oder, wie bei den 6 anderen normalen Kaninchen, eine Auflösung von Immunserum in $^1/_2$ ccm Bouillon, jedesmal nach Zusatz von Cholerakultur. Die mit dem Gemisch versehenen Spritzen lagen ca. $^1/_2$ Stunde im Brütschranke und es wurde sofort, ohne Verzögerung, eingespritzt. Die Menge Cholera stieg von 1 Oese — in dem ersten Versuche — auf eine ganze Kultur — den letzten dreien. Die Tiere wurden nach 7—30 Minuten getötet und die Lungen in Alkohol eingelegt. Die Färbung der in Celloidin eingebetteten Präparate wurde sowohl mit Thionin wie mit verdünnter, frisch bereiteter Ziehl'scher Lösung vorgenommen. In einer Reihe von Präparaten konnten nun Körnchen in Blutgefäßen außerhalb von Leukocyten teils frei, teils auf, teils neben roten Blutkörperchen gefunden werden, die nach Farbe und Aussehen vollkommen gefärbten Granulis glichen. Indessen sind andere Gebilde in der Blutbahn leicht in der Lage, Aehnliches vorzutäuschen, so daß ich auf den Ausfall dieser Experimente kein so entscheidendes Gewicht legen möchte, wie auf den Ausfall der folgenden Reihe, die die Auflösung in der Bauchhöhle 24 Stunden nach erfolgter Bouilloneinspritzung betraf.

Schon Pfeiffer (8) hatte auf die Behauptung Metschnikoff's (9), daß durch eine intraperitoneale Injektion von Bouillon die Phagolyse und dadurch die extracelluläre Auflösung der Bakterien verhindert wurde, entgegenstehende Resultate erhalten. Ihm hatte Bordet (10) eingewendet, daß er wahrscheinlich kalte Kulturen eingespritzt habe, deren niedere Temperatur die Leukocyten vielleicht für einen Augenblick gelähmt habe. Als Abel (11) bei Besprechung der betreffenden Arbeiten erwähnte, daß er die gleichen Ergebnisse wie Pfeiffer erhalten hätte, erhob Metschnikoff (12) den Einwand, Abel müsse alte Bouillon verwandt haben. Um diesen Einwänden zu begegnen, wählte ich zur Injektion nur ganz frische Bouillon, die warm (37°) in die Bauchhöhle eingespritzt wurde. Um eine eventuelle, supponierte Lähmung der Leukocyten auszuschließen, wurde nicht nur das Bakteriengemisch am anderen Tage eine halbe Stunde in der Spritze im Brütschranke gelassen und sofort in die Bauchhöhle injiziert, sondern es wurde auch eine kleine Flüssigkeitsmenge gewählt ($^1/_2$ ccm). Auch wurde zur Bereitung der Bouillon nicht nur das hier gebräuchliche Witte'sche Pepton verwendet, sondern in einem Teile der Versuche auch frisch von Chapoteau (Paris) bezogenes. Die Injektion erfolgte, wie bei allen Versuchen, an der Bauchhöhle des hierzu benutzten Meerschweinchens — nach vorheriger Durchschneidung der Bauchdecke — mit stumpfer Kanüle. Vor der Einspritzung des Bakteriengemisches

wurde mit Kapillare geprüft, ob eine reichliche Menge polynukleärer Leukocyten vorhanden war. Der erste Versuch, in dem die gefundene Anzahl nicht reichlich genug erschien, schied aus; es blieben noch 9 Versuche, 6 an normalen, 3 an immunisierten Meerschweinchen. Alle hatten übereinstimmend das gleiche Ergebnis: völlige Auflösung der Bakterien außerhalb der Leukocyten, dabei allerdings auch Vorhandensein von Granulis in Leukocyten, aber in so relativ geringer Zahl, daß dieses letztere nur als eine nebensächliche Erscheinung gedeutet werden kann; vor allem ging aber deutlich hervor, daß trotz der Einwände Metschnikoff's gegen die früheren Experimentatoren (Pfeiffer, Abel) seine Behauptung nicht mehr aufrecht erhalten werden können.

Als Beispiel führe ich den folgenden Versuch an (No. XXI).

Meerschweinchen von 200 g, erhält am 19. Juni mittags die Bouilloneinspritzung.

20. Juni (24 Stunden nachher) massenhaft Leukocyten in der Bauchhöhle (polynukleäre).

12 Uhr 45 Minuten Injektion von Immunserumcholeragemisch, das $^3/_4$ Stunde im Brütschranke gelegen hatte.

12 Uhr 50 Minuten (5 Minuten) massenhaft Leukocyten, massenhaft Vibrionen, unbeweglich, freiliegend; ganz vereinzelt freiliegende Granula. Das gefärbte Präparat zeigte: meist freiliegende Vibrionen, einzelne freie Granula, einzelne Granula und mehrfach Vibrionen in Leukocyten; indes sind sowohl die Leukocyten wie auch die Hauptmassen der Vibrionen und die wenigen Granula getrennt voneinander.

12 Uhr 55 Minuten (10 Minuten) einzelne Leukocyten enthalten Vibrionen und Granula, die Hauptmenge der Granula frei, auch Häufchen derselben freiliegend, vereinzelte Vibrionen. Im gefärbten Präparate: einzelne Stellen wie besät mit Granulis, welche freiliegen, an anderen Stellen wenige freiliegende Granula; einzelne blasse Stäbchen; in verschiedenen Leukocyten Häufchen von Granulis, andere Leukocyten ohne solche.

1 Uhr 30 Minuten (45 Minuten) nur noch vereinzelte Granula freiliegend. Der Prozeß der Bakterienauflösung ist vollendet.

Während Metschnikoff in seiner diesbezüglichen Arbeit (8) den Prozeß so schildert, daß nach 1 Minute die größte Menge der Vibrionen in den Phagocyten ist und es nach 3, 4 und 5 Minuten weder extracellulär liegende Vibrionen noch extracelluläre Granula giebt, haben meine Versuche die Richtigkeit der entgegenstehenden Versuche von Pfeiffer und Abel bestätigt, demnach die Behauptung von der Verbreitung der extracellulären Bakterienauflösung durch eine 24 Stunden vorher erfolgte Einspritzung von Bouillonkultur widerlegt.

III. In geeigneter Weise abgetötete Leukocytenmengen enthalten mehr Komplemente als das entsprechende Serum.

In dieser Form hat allerdings Metschnikoff seine Ansicht nicht ausgesprochen; sie geht aber aus den entsprechenden Experimenten seines Institutes und den darauf basierenden Schlußfolgerungen in seinem letzten Buche hervor. M. ist der Ansicht, daß die Komplemente — Cytasen — an den Leukocyten haften; sind sie im Blute oder in den Körpersäften vorhanden, so kommt dies daher, daß Leukocyten zu Grunde gegangen sind und eine Spur Cytase entweichen ließen. Ebenso läßt sich das Vorhandensein von Cytase im Serum nach M. nur

dadurch erklären, daß beim Koagulieren des den Gefäßen entnommenen Blutes Leukocyten zu Grunde gehen. Daraufhin unternahm es Gengou (13), in einem ungerinnbaren Blutplasma das Fehlen von Komplementen nachzuweisen, indem er mittels paraffinierter Röhrchen Blut entnahm und so ein mehrere Stunden flüssiges Blut erhielt. Trotzdem kommt G. zu dem Ergebnisse, daß in manchen Experimenten die Cholera ebenso schnell im Plasma, dem ungeronnenen Blute, zu Grunde ging als im Serum. M. erklärt dies damit, daß wohl etwas Cytase aus Leukocyten entwichen sein muß. Bei dieser Unsicherheit der Ergebnisse und der geringen Beweiskraft derselben beschränkten wir uns auf die Vergleichung der Leukocyten mit dem Serum.

Derartige Versuche, an einer Ansammlung von Leukocyten eine größere Baktericidität nachzuweisen, sind von einer ganzen Reihe von Forschern schon unternommen worden, ohne ein einheitliches Resultat zu geben. Allen diesen Experimenten lag der Gedankengang zu Grunde, daß, wenn in den Leukocyten die Ursache der baktericiden Fähigkeit des Organismus zu suchen sei, man in einer großen Menge derselben, die man sich auf verschiedene Weise künstlich herstellen kann, eine größere baktericide Kraft finden müsse, als im Serum desselben Tieres, das nur durch Zerfall einiger Leukocyten etwas baktericide Fähigkeit erhielt. Auf alle diese Experimente einzugehen, erübrigt sich jetzt um so mehr, als die größte Anzahl derselben in eine Zeit fällt, in der man nur die ganze baktericide Kraft prüfte, während wir jetzt die beiden Komponenten — Amboceptor und Komplement — gesondert prüfen müssen. Wie wir schon oben sahen, giebt auch Metschnikoff jetzt das Cirkulieren des Amboceptors im Blute zu, so daß wir uns nur mit den zwei Autoren zu beschäftigen brauchen, welche die Leukocyten auf ihren Gehalt an Komplementen prüften. Es sind dies Moxter (13) und Levaditi (14). Moxter hatte die Wirkung der Leukocyten im hängenden Tropfen beobachtet und war zu dem Ergebnisse gekommen, daß sie eine geringere Zahl von Komplementen besäßen als das Serum dieser Tiere. Da seine Leukocyten noch bis zum Schlusse der Experimente Bewegung gezeigt hatten, erklärte Metschnikoff für die Ursache dieses Ergebnisses den Umstand, daß die Leukocyten nicht abgestorben gewesen wären und darum die Cytase nicht hätte entweichen können. Levaditi untersuchte deshalb auf M.'s Veranlassung die Wirkung der abgetöteten Leukocyten; wie aber seine Experimente, namentlich No. 4 und No. 5, aufs deutlichste ergaben, hatten die Leukocyten auch nicht die geringste Menge Komplemente mehr als das Serum. Und der Gehalt an Komplementen, die sie noch besaßen, rührt, wie wir weiter unten sehen werden, hauptächlich wohl daher, daß sie nur 2mal ausgewaschen waren, wodurch noch etwas Komplement an ihnen haften blieb.

Meine Versuchsanordnung war folgende: Kaninchen wurden 8 ccm steriler, warmer Aleuronataufschwemmung in jede Pleurahöhle eingespritzt; am folgenden Tage wurde das Exsudat (meist polynukleäre und einkernige, kleine Leukocyten) steril entnommen, mit physiologischer Kochsalzlösung ausgewaschen und zwar nicht einmal, sondern mehrere Male und jedesmal centrifugiert. Nach dem letzten Auswaschen wurde die gleiche Menge Bouillon zugesetzt, das Röhrchen sofort in eine Mischung von Schnee und Salz gestellt, dort 2—3 Stunden gelassen, darauf sofort in den Brütschrank bei 37° gebracht und hier 24 Stunden gelassen (Verfahren von Buchner). Hierdurch erst soll nach Leva-

diti die ganze Cytase frei werden. Den Amboceptor lieferte Immunserum einer Ziege.

In dem ersten Versuche, in welchem nur 3mal die Leukocyten ausgewaschen waren, ergab sich folgendes:

1) 1 Oese Serum + 1 Oese Immunserumlösung (hängender Tropfen) 12 Uhr 46 Minuten Einsaat von Vibrionen; sofort viele Vibrionen zu sehen. 1 Uhr 7 Minuten mehr Granula als Vibrionen, 1 Uhr 22 Minuten Umwandlung weiter fortgeschritten, 1 Uhr 45 Minuten weitaus am meisten Granula, vereinzelte Vibrionen.

2) Zum Vergleiche 1 Oese Leukocytenextrakt + 1 Oese Immunserumlösung; 12 Uhr 7 Minuten Einsaat der Cholera; sofort viele Vibrionen; 12 Uhr 30 Minuten vielfach Granula, weitaus am meisten Vibrionen; 12 Uhr 55 Minuten dasselbe Bild, 1 Uhr 5 Minuten ebenso, 1 Uhr 15 Minuten ebenso.

In dem zweiten Versuche wurden die Leukocyten 4mal ausgewaschen; sie zeigt jetzt gar keine Wirkung. Die Versuchsanordnung wie im ersten Versuche.

In einem dritten Versuche wurde die Mischung von Leukocytenextrakt etc. mit der Immunserumlösung im Reagenzglase vorgenommen. Es wurde immer 1 ccm Flüssigkeit gewählt und je 1 Oese Cholera fein verrieben, tüchtig umgeschüttelt und, nach dem Vorgange von Levaditi, die Wirkung nach 1 Stunde geprüft. Jedoch wurden immer mehrere Präparate gemacht, und zwar nicht nur im hängenden Tropfen, sondern auch nach Färbung mit Thionin resp. verdünnter Ziehl'scher Lösung geprüft. In diesem Versuche wurde auch das von den Leukocyten durch Centrifugieren befreite Exsudat in den Kreis der Betrachtung gezogen, und es ergab sich als Gesamtresultat in Uebereinstimmung mit dem oben Gefundenen und mit den Ergebnissen von Levaditi, daß die Leukocyten unmöglich die Lieferer des Komplementes sein konnten.

18. Juni früh 8 Uhr Blut entnommen.

$^1/_2$ 12 Uhr das Serum geprüft.

a) 0,25 Serum + 0,1 Immunserumlösung + 0,65 physiologischer Kochsalzlösung; nach 1 Stunde völlige Umwandlung in Granula.

b) 0,1 Serum + 0,1 Immunserumlösung + 0,8 physiologischer Kochsalzlösung; nach 1 Stunde sehr starke Umwandlung in Granula, wenn auch nicht so vollständig wie bei a). Die Immunserumlösung (I.S.) ist eine Lösung von 0,1 Immunserum auf 3,0 physiologischer Kochsalzlösung, so daß 0,1 auf 1,0 einer Mischung von 1 : 300 entspricht; diese Verdünnung wurde gewählt, weil die Agglutinationsgrenze dieses Serums 1 : 200 betrug, und ich die störende Wirkung der Zusammenballung der Vibrionen vermeiden wollte.

Diesem Tiere wurde Aleuronat in die Pleura injiziert, am 19. Juni entnommen, sofort centrifugiert etc., wie oben angegeben. Das Exsudat enthielt massenhaft polynukleäre Leukocyten. Das durch Centrifugieren gewonnene zellfreie Exsudat untersucht, ergab folgendes:

0,9 Exs.	+ 0,1 I.S.;	nach 1 Stunde fast völlige Granulabildung		
0,5	+ 0,1 I.S.	+ 0,4	physiologischer Kochsalzlösung	dasselbe Bild
0,25	+ 0,1 „	+ 0,65	„ „	„ „
0,1	+ 0,1 „	+ 0,8	„ „	„ „

Dagegen ergab das Leukocytenextrakt nach 4maliger Auswaschung:

0,9 Leuk.	+ 0,1 I.S.			fast gar keine Wirk., ab u. zu ein Granul.
0,5 „	+ 0,1 „	+ 0,4	phys. Kochsalzlös.	„ „ „ „ „ „ „ „
0,25 „	+ 0,1 „	+ 0,65	„ „	„ „ „ „ „ „ „ „
0,1 „	+ 0,1 „	+ 0,8	„ „	„ „ „ „ „ „ „ „

Also auch trotz Abtötung der Leukocyten ist in der Exkretionsflüssigkeit kaum eine Spur von Komplement zu finden, während das Serum und das zellfreie Exsudat sehr beträchtliche Mengen aufweisen.

Da alle Versuche, in den Leukocyten die Bildungsstätte der Komplemente für die Choleraimmunität zu suchen, fehlschlugen, versuchte ich analog dem Vorgehen von Pfeiffer und Marx (5), sie in anderen Organen zu finden. Es wurden Organe eines eben getöteten Tieres — Milz, Leber, Nebenniere — in einem Mörser mit einem gleichen oder vielfachen Volumen physiologischer Kochsalzlösung, das durch die Verdrängung der Wassermenge bestimmt wurde, verrieben und sofort in der geschilderten Weise auf den Gehalt an Komplementen untersucht; zum Vergleiche wurde Blut aus verschiedenen Körperstellen, sowie Harn und Galle gewählt. Auch erhielt ich zufällig Lymphe aus dem Ductus thoracicus eines Hundes, dessen Blut ebenfalls geprüft wurde. Keines der geprüften Medien enthielt mehr Komplemente als das zugehörige Blut resp. Serum. Auch 7-tägige Nahrungsentziehung — beim Kaninchen —, Morphium + Aether — bei einem Hunde —, Blutegelextrakt bei demselben, Antipyrininjektion bei einem anderen Hunde hatten keinen nachweisbaren Einfluß auf den Komplementgehalt.

Ist es deshalb auch nicht gelungen, den Ursprung der Komplemente für die Choleraimmunität nachzuweisen, so kann man mit Sicherheit dagegen behaupten, daß es keinen Anhaltspunkt dafür giebt, daß die Leukocyten auch nur die geringste Beziehung zu demselben haben.

Herrn Prof. Dr. Pfeiffer gestatte ich mir auch an dieser Stelle meinen verbindlichsten Dank für die Anregung zu dieser Arbeit und die stete Förderung bei derselben auszudrücken.

Litteratur.

1) Moxter, Die Beziehungen der Leukocyten zu den bakterienauflösenden Substanzen tierischer Säfte. (Dtsch. med. Wochenschr. 1899. p. 687.)
2) Gengou, Origine de l'alexine .... (Ann. de l'Inst. Pasteur. T. XV. 1901. p. 68.)
3) Metschnikoff, L'immunité dans les maladies infectieuses. Paris 1901.
4) Buchner, Ueber Immunität, deren natürliches Vorkommen .... (Münch. med. Wochenschr. 1891. No. 32 u. 33.)
5) Pfeiffer und Marx, Die Bildungsstätte der Choleraschutzstoffe. (Zeitschr. f. Hyg. etc. Bd. XXVII. 1898.)
6) Deutsch, Origine des anticorps typhiques. (Ann. de l'Inst. Pasteur. T. XIII. 1899.)
7) Wassermann, Weitere Mitteilungen über Seitenkettenimmunität. (Berl. klin. Wochenschr. 1898. p. 209.)
8) Pfeiffer, Ein neues Grundgesetz der Immunität. (Dtsch. med. Wochenschr. 1896. p. 121.)
9) Metschnikoff, Destruction extracellulaire des bactéries. Ann. de l'Inst. Pasteur. 1895. p. 433.)
10) Bordet, Mode de l'action des sérums préventifs. (Ann. de l'Inst. Pasteur. 1896. p. 193.)
11) Abel, Centralbl. f. Bakt. etc. 1896. p. 761.
12) Metschnikoff, Immunität in Weyl's Handbuch der Hyg. p. 30. Anm.
13) Gengou, Origine de l'alexine. (Ann. de l'Inst. Pasteur. 1901. p. 232.)
14) Moxter, Wirkungsweise der bakterienauflösenden Substanzen. (Centralbl. f. Bakt. etc. Abt. I. Bd. XXVI. 1899. p. 344.)
15) Levaditi, Etat de la cytase dans le plasma. (Ann. de l'Inst. Pasteur. T. XV. 1901.)

Zur Frage der Präcipitationsvorgänge.

Bemerkungen zu den Mitteilungen von Philipp Eisenberg im Centralbl. f. Bakteriol. Abt. I. Orig. Bd. XXXI. 1902. No. 15 und in den Extraits du Bulletin de l'Académie des Sciences de Cracovie. Mai 1902. p. 289.

Von Dr. **J. Halban** und Dr. **K. Landsteiner.**

Ueber die Präcipitationsreaktion hat vor kurzem Ph. Eisenberg ein Autorreferat unter den Originalmitteilungen dieser Zeitschrift veröffentlicht, eine ausführlichere Abhandlung über denselben Stoff in den Schriften der Krakauer Akademie. Seine Resultate treffen teilweise mit Beobachtungen zusammen, die wir vorher (Münchener med. Wochenschr. 1902. No. 12) veröffentlicht haben.

Eisenberg berücksichtigt zwar in seinem Referate unsere Arbeit nicht, macht aber in der anderen Mitteilung Bemerkungen über dieselbe, die wir richtigstellen wollen, und zwar an diesem Orte, da das hier erschienene ausführliche Originalreferat leicht ohne Zuhilfenahme der in den Krakauer Akademieberichten publizierten Schrift benutzt werden könnte.

1) E. behauptet, daß wir den chemischen Charakter der Präcipitinreaktion in Abrede stellen (p. 290). Es scheint hier ein Mißverständnis vorzuliegen. Thatsächlich sprachen wir über den chemischen Charakter der Reaktion keine Ansicht aus, außer daß wir sagten, daß „die Präcipitation ähnlich wie die Agglutination als eine Reaktion auf bestimmte chemische Anordnungen (innerhalb des Eiweißmoleküls?) aufzufassen" sei (p. 10). Das Mißverständnis scheint durch den von uns ausgesprochenen Satz entstanden zu sein, daß „die Präcipitinreaktion keineswegs als Reaktion auf Eiweiß im chemischen Sinne aufzufassen" sei (p. 9). Wir sagten damit nicht, wie E. zu verstehen scheint, daß die Präcipitation nicht als Reaktion im chemischen Sinne anzunehmen sei, sondern nicht als Reaktion auf Eiweiß im chemischen Sinne, d. h. auf eine Substanz, welche als Eiweiß chemisch in bestimmter Weise charakterisiert ist. Es geht diese Bedeutung außer aus dem Wortlaut auch aus der ihm folgenden Begründung hervor. Denn wir erwähnen dort, daß es bisher nicht gelungen sei, für jeden Eiweißkörper ein Präcipitin herzustellen und daß Einwirkungen, bei welchen das Eiweiß im Sinne des Chemikers erhalten bleibt, das Verhalten gegenüber den Präcipitinen verändern können. Die Möglichkeit unserer Auffassung wurde durch die seither mitgeteilten Untersuchungen von Pick und Obermeyer[1]), Landsteiner[2]) und Calvo bestätigt. Gegen diese Ueberlegung würde es auch nicht sprechen, wenn, wie E. meinte, es thatsächlich richtig wäre, daß bei dem von uns angeführten Falle der Erhitzung von salzfreiem Eiweiß auf 100° dieses denaturiert würde und die Lösung dann kein natives Eiweiß enthielte. Denn wir sagten nicht, daß die Präcipitation keine Reaktion auf natives Eiweiß sei. Die Annahme von E. (p. 290), daß eine kein natives Eiweiß enthaltende Lösung keine Präcipitinreaktion geben könne, ist willkürlich.

2) E. beobachtete eine Eigentümlichkeit des Verlaufs der Präcipitin-

1) Wien. klin. Rundschau. 1902.
2) Dieses Centralbl. 1902. No. 15.

reaktion. Er fand nämlich, daß ein Ueberschuß der präcipitablen Substanz die Entstehung des Niederschlages hemmt. Dieselbe Beobachtung haben wir vor ihm mitgeteilt. E. meint, nicht entscheiden zu können, ob die von uns gemachte Beobachtung mit der seinen zu identifizieren sei, wegen einer — wie er sagt — etwas ungenauen Ausdrucksweise unsererseits. Man könnte nach E. daran denken, daß bei unserer Versuchsanordnung nur die Verdünnung des Präcipitins, nicht der Ueberschuß der präcipitablen Substanz wirksam gewesen sei.

Dazu ist zu bemerken, daß wir der Kürze halber nicht erwähnten, daß wir bei den Versuchen mit verschiedenen Mengen präcipitabler Substanz das Volumen (durch physiologische Kochsalzlösung) gleich machten, weil wir diese Vorsicht für selbstverständlich hielten. Daß es sich aber nicht nur um eine Wirkung der Verdünnung handeln könne, geht auch aus unserer Abhandlung hervor, da wir darin die Beobachtung mitteilen, daß es bei der Zufügung von Serum nicht gleichgiltig ist, von welcher Tierart es stammt, sondern daß das der Präcipitation unterliegende Serum in unseren Versuchen den stärksten hemmenden Einfluß hatte.

Der Zweifel E.'s ist deshalb auffallend, weil er ja thatsächlich dieselbe Beobachtung machte, wie wir und den angegebenen Ablauf der Präcipitinreaktion als einen allgemein giltigen ansieht. Sollte dieser Ablauf gerade nur in dem Falle nicht stattfinden, den wir beobachteten, und in dem wir dasselbe wie E. vor ihm fanden?

3) E. sagt (S. 295): „Jedenfalls ist diese Hemmung keine spezifische Serumwirkung, wie diese Autoren (H. und L.) anzunehmen scheinen.“ Wie E. zu dieser Ansicht über unsere Meinung kommt, wissen wir nicht, da wir keine derartige Aeußerung gemacht haben. Wir wissen auch nicht, welche Bedeutung in seinem Satze das Wort „spezifische Serumwirkung“ haben soll.

Wir haben in unserer Arbeit nur darauf aufmerksam gemacht, daß die Hemmung des sichtbaren Effektes der Serumreaktionen durch einen Ueberschuß von wirksamem Serum allgemeinere Giltigkeit habe und haben als Beispiele die sogen. „Komplementablenkung“ von Neisser und Wechsberg und die Agglutinationsreaktionen angeführt.

Ueber Inaktivierungsversuche mit Präcipitinen.

[Aus dem städtischen Krankenhause Gitschiner Str. 104/5 in Berlin (dirig. Arzt Prof. Dr. Litten).]

Von Dr. **L. Michaelis** in Berlin.

I.

Die Resultate, zu denen ich in dieser Arbeit gelange, wurden mit vielen Umwegen durch zahlreiche Versuchskombinationen gewonnen. Ich will der Einfachheit halber die Thatsachen nur an der Hand meiner letzten Versuchsreihe schildern, welche ich zur Kontrolle der früheren Ergebnisse anstellte.

Das Serum eines gegen Rinderserumeuglobulin immunisierten Kaninchens reagierte gegen Rinderserum stark; bezüglich der einzelnen

Fraktionen des Rinderserums verhielt es sich so, daß es gegen Globulin stark, und zwar gegen Pseudoglobulin stärker als gegen Euglobulin reagierte. Dagegen wirkte es auf Albumin nicht.

Es wurde nun ein Teil dieses Immunserums im Wasserbade 1/4 Stunde lang auf 68° erhitzt. Dann hatte es völlig die präcipitierende Eigenschaft verloren. Wenn nun dieses inaktivierte Serum zunächst auf eine geringe Menge Rinderpseudoglobulin einwirkte und nach einer Stunde aktives Präcipitin hinzugefügt wurde, so ergab sich, daß die Niederschlagsbildung wohl zeitlich ein wenig gehemmt wurde, aber schließlich doch eintrat. Die zeitliche Hemmung ist die Folge der Verdünnung des Gemisches mit einem an der Reaktion nicht beteiligten Eiweißkörper, welcher das Ausfallen eines Niederschlages infolge seiner kolloiden Natur physikalisch hemmt. Genau dieselbe zeitliche Hemmung läßt sich durch die verschiedenartigsten Eiweißkörper erreichen, welche in genau gleicher Anordnung wie bei dem soeben angedeuteten Versuche hinzugefügt wurden. Ich versuchte Pferdeserumglobulin, Pferdeserumalbumin, menschliches Blutserum, sogar Deuteroalbumose in 5-proz. Lösung, alle mit demselben Resultate. Die letzte hindert sogar besonders stark das Ausfallen des Niederschlages. Sehr gleichmäßig fielen die Hemmungsversuche mit Menschenserum aus, nachdem ich es der Analogie halber vorher auf 68° erhitzt hatte. Die Viskosität ist dann der des inaktivierten Serums noch ähnlicher. Durch Hinzufügen etwas größerer Mengen beliebiger Eiweißkörper kann man die Reaktion sogar völlig, nicht nur zeitlich, hemmen. Die Ursache ist hier rein physikalisch, und es ist mir bei meinen Seris nicht gelungen, die Existenz eines „Präcipitoids" nachzuweisen (Kraus und Freiherr von Picquet[1]), Eisenberg)[2]).

II.

Dagegen hatte das inaktivierte Serum, in etwas größeren Dosen angewandt, eine anderere überraschende Eigenschaft gewonnen.

Wenn man nämlich eine Serie von Röhrchen ansetzt mit gleichem Gehalte an fällbarem Eiweiß und einer gleichen, etwas gering bemessenen Menge von aktivem Präcipitin, so nimmt die Menge des sich bildenden Niederschlages proportional einer nunmehr zugefügten Menge von inaktiviertem Präcipitin zu in derselben Weise, als ob man nicht inaktiviertes, sondern aktives Immunserum zufügte.

	Rinderpseudoglobulin	Physiol. ClNa	Aktives Präcipitin	Inaktiviertes Serum	Menge des Niederschlages
1	0,2	0,65	0,15	—	+ (schwach)
2	0,2	0,55	0,25	—	++
2a	0,2	0,55	0,15	0,1	++
3	0,2	0,3	0,5	—	++++
3a	0,2	0,3	0,15	0,35	++++

Kontrollen:
a) Inaktiviertes Serum 0,3, physiol. ClNa 0,2, Rinderpseudoglobulin 0,15, Reaktion 0.
b) Aktives und inaktiviertes Serum reagieren gegeneinander nicht.

1) Centralbl. f. Bakt. etc. Abt. I. Bd. XXVII. No. 1.

2) Beiträge zur Kenntnis der spezifischen Präcipitationsvorgänge. (Bull. de l'acad. des sciences de Cracovie. 1902. p. 289 und Centralbl. f. Bakt. etc. Abt. I. Originale. Bd. XXXI. No. 15.)

Noch anschaulicher wird der Versuch, wenn man die Menge des aktiven Präcipitins im Verhältnis zur Menge des fällbaren Eiweißes so klein wählt, daß überhaupt keine erhebliche Reaktion eintritt. Auch in solchem Falle gelingt es leicht, durch Hinzufügen von inaktiviertem Immunserum eine kräftige Reaktion zu erhalten.

Rinderserum-pseudo-globulin	Physiol. ClNa	Aktives Immunserum	Inaktiviertes Immunserum	Normales frisches Kaninchenserum	Stärke der Reaktion
0,25	0,75	0,5	—	—	+++
0,25	0,75	—	0,5	—	0
0,25	1,05	0,2	—	—	fast 0
0,25	0,75	0,2	0,3	—	+++
0,25	0,95	—	0,3	—	0
0,25	0,75	0,2	—	0,3	Spur
0,25	0,95	—	—	0,3	0

Aus den letzten Versuchen dieser Tabelle geht auch hervor, daß normales frisches Kaninchenserum durchaus nicht das inaktivierte Immunserum vertreten kann, und auch an und für sich keine Reaktion gegen das fällbare Eiweiß ausübt. (Allerdings scheint normales Kaninchenserum auch ein geringes, aber nicht mit der Wirkung des inaktivierten Immunserums vergleichbares Reaktivierungsvermögen zu besitzen.)

Die Deutung dieses Versuches kann nur folgende sein: In dem Immunserum sind zwei Stoffe enthalten, der eine in sehr reichlicher Menge; er ist thermolabil. Der andere ist in geringerer Menge vorhanden und ist thermostabil. Zum Unterschiede des bekannten Verhaltens der hämolytischen Sera sind aber beide Stoffe nur im Immunserum und keiner von ihnen, entsprechend etwa dem Komplement bei der Hämolyse, im normalen Serum vorhanden. Spätere Versuche werden zu zeigen haben, ob die beiden hier in Betracht kommenden Stoffe sich wie Amboceptoren und Komplement des hämolytischen Serums verhalten und wenn ja, welcher dem Komplement und welcher dem Amboceptor entspricht.

Berlin, den 25. Juli 1902.

Zur Schnelldiagnose der Typhusbacillen.

Eine Nachprüfung des von Weil angegebenen Nährbodens.

Von Dr. **Georg Jochmann.**

Mit 1 Tafel.

Die aus dem Jahre 1899 stammende Mitteilung (1) Piorkowski's über ein einfaches Verfahren zur raschen Sicherstellung der Typhusdiagnose hat eine Flut von Nachprüfungen nach sich gezogen, ein Beweis dafür, wie wünschenswert es erscheint, einen Nährboden zu besitzen, der in möglichst kurzer Zeit eine Differentialdiagnose zwischen Bact. coli und dem Typhusbacillus ermöglicht. Die Arbeiten, die sich damit beschäftigen, führten in der Mehrzahl zu einem Resultat, wie es

z. B. auch E. Scholz und P. Krause (2) erzielten, daß nämlich die Piorkowski'sche 3,3-proz. Harngelatine eine wertvolle Bereicherung der bakteriologischen Untersuchungsmethoden sei, daß aber aus dem Plattenbefunde allein nie die Diagnose Bac. typhi mit Sicherheit gestellt werden könne, stets seien die chemisch-biologischen Methoden noch heranzuziehen.

Der praktischen Anwendung der Piorkowski'schen Methode stellten sich verschiedene Schwierigkeiten entgegen. Einmal ist es schwer, den dazu vorgeschriebenen alkalischen Urin von ganz bestimmtem spezifischen Gewicht zu bekommen, ferner ist eine konstante Temperatur von 22° C nur durch sehr genau arbeitende und deshalb nicht überall leicht verfügbare Thermostaten zu erhalten und schließlich ist es eine große Schwierigkeit, die verdünnte Harngelatine, besonders in den Sommermonaten, vor Verflüssigung zu bewahren, da sie bereits bei 23° C beginnt, sich zu verflüssigen.

Einen Nährboden zu konstruieren, der frei sein soll von all diesen Uebelständen der Harngelatine und trotzdem dieselben Vorteile wie jene besitzen soll, hat Weil unternommen. Er berichtet darüber in der Hygienischen Rundschau. 1901. No. 10 unter dem Titel: „Zur Schnelldiagnose der Typhusbacillen".

Der Nährböden ist, wie folgt, zusammengesetzt:

600 g geschälte Kartoffel werden auf dem Reibeisen zerrieben und etwa 12 Stunden in einer Glasschale unterhalb 15° C stehen gelassen, der Saft alsdann durch ein Koliertuch mittels Händedruckes abgepreßt.

300 g des Filtrates vermische mit 200 g schwach alkalischer Bouillon, hierin löse im Dampftopf 3,75 g feinsten Agar-Agars vollständig auf; vom gebildeten Bodensatz filtriere ab und verteile in Reagiercylinder. Die Sterilisation erfolge bei 2 Atmosphären, sie ist nach 1 Stunde beendet.

Dieser 0,75-proz. agarhaltige Kartoffelfleischsaft ist dunkelgelb bis dunkelbraun, reagiert schwach sauer.

Nachdem Herr Weil die Freundlichkeit hatte, mir eine größere Menge des von ihm bereiteten Nährsubstrates zur Verfügung zu stellen, habe ich dasselbe im Eppendorfer Krankenhause einer Nachprüfung unterzogen. Mit dem mir überlassenen Quantum sowie mit größeren Mengen, die ich mir zu verschiedenen Malen selbst bereitete, habe ich folgende Erfahrungen gemacht, über die ich kurz berichten will.

Weil giebt an, daß bei einer Temperatur von 36°—37,5° C die beschickten Agarplatten schon nach 12 Stunden charakteristische Formen zeigen. Die Typhuskolonieen besitzen dann nach Weil die von Piorkowski beschriebenen charakteristischen Ausläufer. „Die Kolonieen sind silbergrau, glänzend und an ihrer feinfaserigen Struktur leicht erkennbar. Nach Ablauf von etwa 20 Stunden verlieren sie einen Teil der zur Differentialdiagnose verwertbaren Eigenschaften, indem sie einen hellgelben bis braungelben Ton annehmen und dadurch in der Farbe Coli-ähnlicher werden.

Die Kolonieen der gleich alten Coli-Platten sind bedeutend größer, meist rund oder oval, gelbbraun, mit körniger innerer Struktur und zeigten um die angeführten Zeiten niemals ausgesprochene Rankenbildungen.

Bei tieferer Einstellung erkennt man auf den 12-, längstens 20-stündigen Platten — in Abhängigkeit von der Höhe der Züchtungstemperatur — die feinfaserigen Typhuskolonieen zwischen den dunkelgelben und dunkelbraunen, stärker entwickelten Coli-Ansiedelungen."

Bei der Nachprüfung war zunächst festzustellen, wie sich verschiedene Coli- und Typhusstämme in Reinkultur auf dem betreffenden Agar verhalten. Es wurden deshalb zu verschiedenen Malen mehrere Coli- und Typhusstämme, von beiden je 6, bezüglich ihres Wachstums auf dem Weil'schen Nährboden in Reinkulturen miteinander verglichen.

Es wurde dabei so verfahren: Von den zu vergleichenden Reinkulturen wurden Bouillonkulturen angelegt und von solchen 24 Stunden alten Bouillonkulturen aus wurden eine Anzahl Röhrchen des betreffenden Agars in verschiedenen Verdünnungen beschickt und damit Platten gegossen. Nach 12 Stunden wurden die Platten untersucht und diejenigen Platten einer besonderen Prüfung unterzogen, die nach Weil die am meisten charakteristischen Formen geben sollen, die nämlich, wo etwa 16 Kolonieen in $^1/_9$ qcm der Wolffhügel'schen Zählplatte zu sehen waren.

Die Ergebnisse der Untersuchungen habe ich in den beigegebenen Tafeln zu skizzieren versucht, da die Beschreibung allein keine genügend deutliche Darstellung des Befundes ermöglicht.

Auf den Typhusplatten fanden sich bei allen 6 von mir geprüften Stämmen bei mäßig starker Verdünnung nach 12 Stunden nachstehend beschriebene Formen von Kolonieen.

Zu bemerken ist vorher, daß diese Formen alle bei der Vergrößerung Zeiss, Apochrom. 16, Kompens.-Okul. 6 gezeichnet sind. Für eine makroskopische Unterscheidung sind dieselben meist zu klein, abgesehen von einzelnen größeren Oberflächenkolonieen, die sich als runde graue Plättchen präsentieren.

Auf einer mäßig stark beschickten Verdünnungsplatte, auf der in $^1/_9$ qcm etwa 16 Kolonieen stehen, finde ich folgende Formen bei einem aus einer Typhusmilz gezüchteten Typhusstamme.

1) (Fig. I). Kolonieen mit oberflächlicher Ausbreitung. Es sind die größten der beobachteten Typen. Von einem hellbraunen, runden, soliden Centrum geht in kreisförmiger Ausbreitung ein aus Fäden bestehendes dichtes Maschenwerk aus. Der äußere Rand dieses Maschenwerkes ist unregelmäßig und man erkennt hier und da noch einige von ihm auslaufende Fädchen.

Diese Kolonieen sind zur Differentialdiagnose nicht zu verwerten, denn Coli bildet, wie wir sehen werden, ganz ähnliche Formen (cf. Fig. V), nur daß die Typhuskolonie sich weniger üppig ausbreitet und ihre Färbung eine hellere ist gegenüber der dunklen Coli-Kolonie. Auch ist das Geflecht des Maschenwerkes bei Typhus etwas lockerer, so daß man bei der angegebenen Vergrößerung deutlich die einzelnen Fädchen erkennen kann, aus denen es besteht, während das bei Coli nicht in diesem Maße der Fall ist.

2) (Fig. II). Dunkelgraue bis hellbraune Kolonieen von unregelmäßiger Form, nicht ausgesprochen rund oder oval, mit nicht ganz regelmäßigem Rande, ohne Ranken- und Fädenbildung.

Auch diese Kolonieen sind nicht brauchbar für eine Unterscheidung zwischen Typhus und Coli, denn genau dieselben Formen bildet auch Coli um dieselbe Zeit, nur daß der Farbton der Coli-Kolonie ein dunklerer ist (cf. Fig. VI).

3) (Fig. III). Wetzsteinähnliche Formen mit seitlicher Ausstülpung. In Fig. III *a* ist eine derartige Kolonie skizziert, bei der man an der Seite kleine höckerige Ausbreitungen ohne Rankenbildung erkennt.

Derartige Wetzsteinformen mit seitlicher Ausstülpung ohne Rankenbildung bildet Coli ebenfalls, wie Fig. VII zeigt. Die Coli-Kolonie ist nur etwas größer und von dunklerem Kolorit.

Die beiden anderen auf Fig. III gezeichneten Formen *b* und *c* haben ovale Form mit deutlicher Fäden- und Rankenbildung im Rande. Es sind dies Formen, die den Uebergang bilden zu den nach Weil für Typhus charakteristischen.

4) (Fig. IV). Die nach Weil für Typhus charakteristischen Kolonieen.

Es ist ein silbergraues, zartes, glänzendes Flechtwerk ohne dunkleres Centrum, nur aus feinsten Fäden bestehend, die in der Mitte etwas dichter liegen und nach dem Rande zu in einzelne, mitunter spiralig gewundene Ranken auslaufen.

Solche Kolonieen findet man bei mäßig starker Verdünnung in großer Menge und in den aus der Figur ersichtlichen Größenverhältnissen (bei der Vergrößerung: Zeiss, Apochromat. 16, Kompens.-Okul. 6). Mit bloßem Auge sind sie auf der Platte nur als feine graue Pünktchen zu erkennen.

Diese eben beschriebenen 4 Formen von Kolonieen, besonders aber die auf Fig. II, III und IV zeigten alle 6 von mir untersuchten Typhusstämme bei einer mäßig starken Verdünnung.

Es galt nun zu untersuchen, ob die in Fig. IV gezeichneten und nach Weil für Typhus charakteristischen Formen auf gleichalterigen Coli-Platten niemals gefunden werden. Wäre dies der Fall, so müßte dem Nährboden eine hohe differentialdiagnostische Bedeutung zugemessen werden.

Ich untersuchte zu diesem Zwecke 6 verschiedene aus Kot gezüchtete Coli-Stämme, welche sämtliche für Bact. coli charakteristischen Merkmale, Gasbildung auf Traubenzuckeragar, Indolbildung, Milchgerinnung etc., aufwiesen.

Bei 4 von diesen Stämmen fand ich das von Weil angegebene Verhalten: Kolonieen ohne jede Ranken- oder Ausläuferbildung auf den 12 Stunden lang bei 37° C bebrüteten Verdünnungsplatten.

Diese 4 Stämme bildeten folgende Formen, die ich zum Vergleich skizziert habe:

1) (Fig. V). Kolonieen mit oberflächlicher Ausbreitung. Von einem dunkelbraunen soliden Centrum geht in kreisförmiger Ausbreitung ein aus einem sehr dichten Fädengewirr bestehendes Maschenwerk aus. Die Farbe desselben ist nach der Mitte zu dunkelbraun und wird nach dem Rande zu heller. Der Rand ist etwas unregelmäßig, ohne Fädenbildung. Auf die geringe Differenz von der entsprechenden Typhuskolonie (cf. Fig. I) ist schon oben hingewiesen.

2) (Fig. VI). Dunkelbraune Kolonieen, zum Teil von unregelmäßiger Form, meist aber wetzsteinförmig oder oval, mit glattem Rande ohne Fäden- und Rankenbildung. Die Kolonieen sind größer und dunkler als die gleichalterige Typhuskolonie, gleichen ihr aber in der Form (cf. Fig. II).

3) (Fig. VII). Wetzsteinähnliche Formen mit seitlicher Ausstülpung. Diese Kolonie entspricht in ihrer Form ganz der gleichalterigen Typhuskolonie (cf. Fig. III*a*).

Feinfaserige Kolonieen mit Ausläufern, wie sie auf gleichalterigen Typhusplatten gefunden werden und wie sie in Fig. IV skizziert sind, konnte ich bei 4 von mir geprüften Coli-Stämmen nicht bemerken.

und, wenn Gasbildung ausblieb, mit den übrigen differentialdiagnostischen Methoden weiter geprüft. Auf diese Weise konnte ich nachweisen, daß von 7 Patienten 5 Typhusbacillen im Stuhl beherbergten. Ein Fall wurde zu 4 verschiedenen Malen untersucht, wobei 3mal Typhusbacillen sich fanden. Im ganzen gelang es also bei 10 Stuhluntersuchungen 7mal Typhusbacillen zu isolieren.

Hierbei ist aber zu bemerken, daß bei jeder Aussaat naturgemäß eine ganze Reihe verdächtiger Kolonieen geprüft wurden und daß dabei doch vielfach auch solche Kolonieen abgestochen wurden, die zwar einen typhusverdächtigen Eindruck erweckten, aber sich hernach durch die biologischen Eigenschaften als Coli-Bacillen differenzierten. Nach den oben beschriebenen Erfahrungen mit Reinkulturen dürfte das ja nicht Wunder nehmen.

Ein Uebelstand ist der, daß die am schönsten gefaserten, also am meisten typhusverdächtigen Kolonieen, wie auch Weil hervorhebt, auf mäßig stark besäten Platten, nicht so auf weniger dicht besäten Platten vorkommen, so daß es mitunter Schwierigkeiten macht, einzelne Kolonieen mit der Platinnadel abzustechen.

Das Resultat unserer Untersuchungen ist also folgendes:

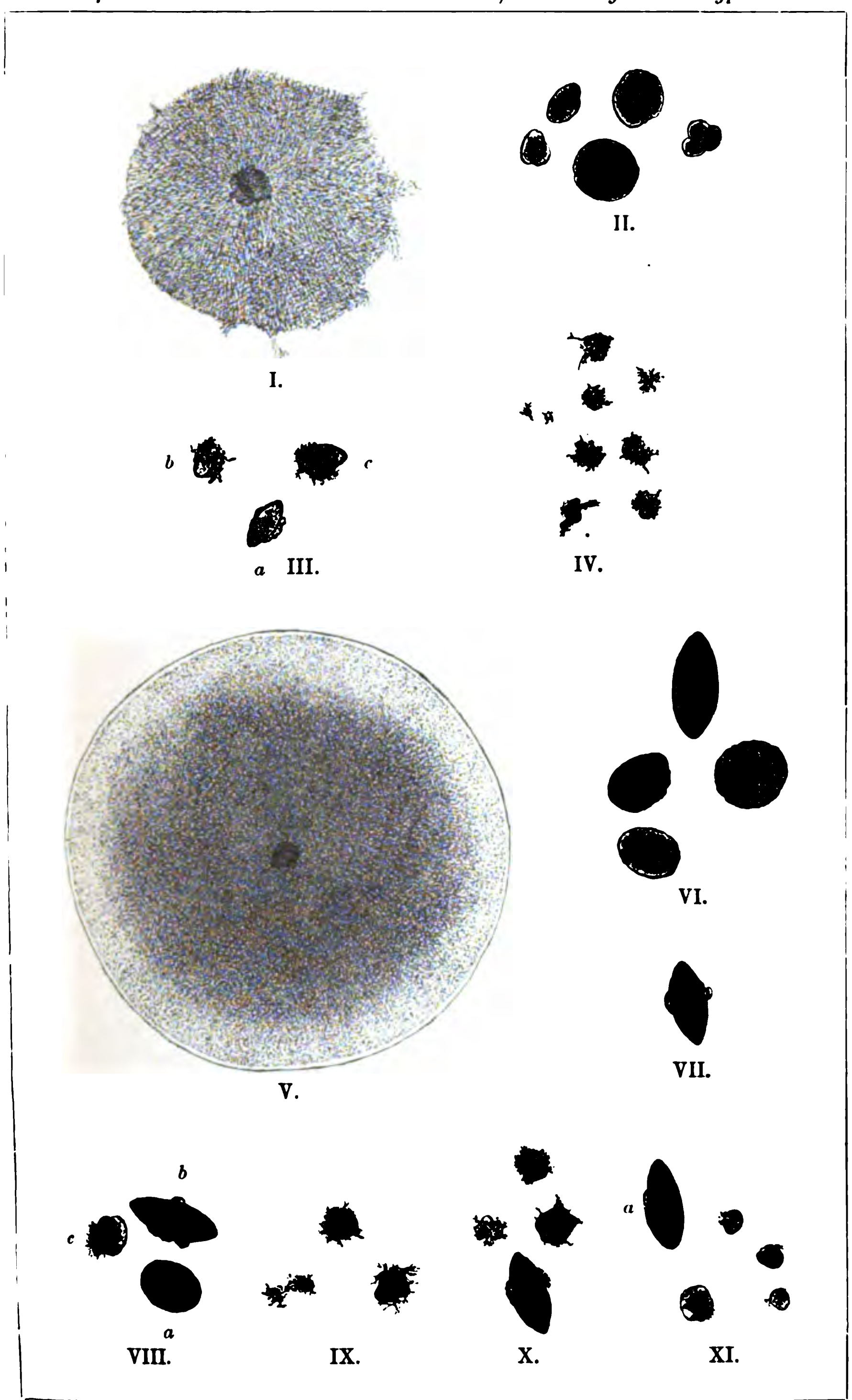
Die Typhusbacillen bilden auf dem Weil'schen niedrig prozentuierten Kartoffelfleischsaftagar ähnlich wie auf der Piorkowski'schen Harngelatine Kolonieen, die aus einem charakteristischen zarten Fädengeflecht teils mit, teils ohne solides Centrum bestehen. Die randständigen Ausläufer und Spiralen sind auf dem Weil'schen Nährboden meist weniger lang ausgewachsen als auf der Piorkowski'schen Harngelatine.

Gegenüber dem Piorkowski'schen Nährboden hat der Weil'sche den Vorzug, leichter hergestellt und bei dem Temperaturoptimum des Typhusbacillus bei 37° C verwendet werden zu können. Die lästige Verflüssigung bei hoher Außentemperatur, die bei der Piorkowski-schen Gelatine oft störend ist, fällt bei dem Weil'schen Agar naturgemäß fort.

Bei der Verwendung des Weil'schen Nährbodens empfiehlt es sich, besonders bei hoher Außentemperatur, wenn die Erstarrung des niedrig prozentuierten Agars nur langsam vor sich gehen will, die Platten auf $^1/_2$ Stunde in den Eisschrank zu stellen. Ist dies geschehen, so können dieselben auch mit dem Deckel nach unten, umgekehrt aufgestellt werden.

Der Weil'sche Nährboden hat gegenüber dem gewöhnlich in Laboratorien als Nähragar verwendeten höher prozentuierten Fleischwasseragar den Vorzug, daß er bei der Aussaat typhusverdächtiger Stühle bereits nach 12 Stunden mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit auf die Erkennung etwa vorhandener Typhuskolonieen hinleitet. Da aber auch gewisse Coli-Stämme ähnlich geformte Kolonieen bilden wie der Typhusbacillus, so kann man nie aus dem Aussehen der Kolonieen allein auf das Vorhandensein von Typhusbacillen schließen, sondern muß stets die differentialdiagnostischen Verfahren zur Sicherstellung der Diagnose mit heranziehen.

Hamburg-Eppendorf, 1. Juli 1902.



Verlag von **Gustav Fischer** in Jena.

Litteratur.

1) Piorkowski, Ein einfaches Verfahren zur Sicherung der Typhusdiagnose. [Berl. med. Gesellschaft. Sitzung vom 25. Januar 1899.] (Berl. klin. Wochenschr. 1899. No. 17.)
2) Scholz, E. und Krause, P., Ueber den klinischen Wert der gegenwärtig gebräuchlichen bakteriologischen Untersuchungsmethoden bei Typhus abdominalis. (Zeitschr. f. klin. Med. Bd. XLI. Heft 5 u. 6.)
3) Schottmüller, Ueber mehrere das Bild des Typhus bietende Krankheitsfälle u. s. w. (Paratyphus). (Zeitschr. f. Hyg. u. Inf. Bd. XXXVI. p. 368.)
4) Holz, Experimentelle Untersuchungen über den Nachweis von Typhusbacillen. (Zeitschr. f. Hyg. u. Inf. Bd. VIII. p. 143.)
5) Klie, Untersuchungen des Wachstums von Bact. typh. abdominalis und Bact. coli commune in Nährböden mit verschiedenem Prozentgehalt an Gelatine bei verschiedenen Temperaturen. (Centralbl. f. Bakt. etc. Bd. XX. No. 2—3.)

Ueber eine neue regulierbare Vorrichtung für den heizbaren Objekttisch [1]).

[Aus dem staatl. serotherapeut. Institute in Wien (Vorstand: Prof. R. Paltauf).]

Von Privatdocent Dr. **R. Kraus**, Assistenten am Institute.

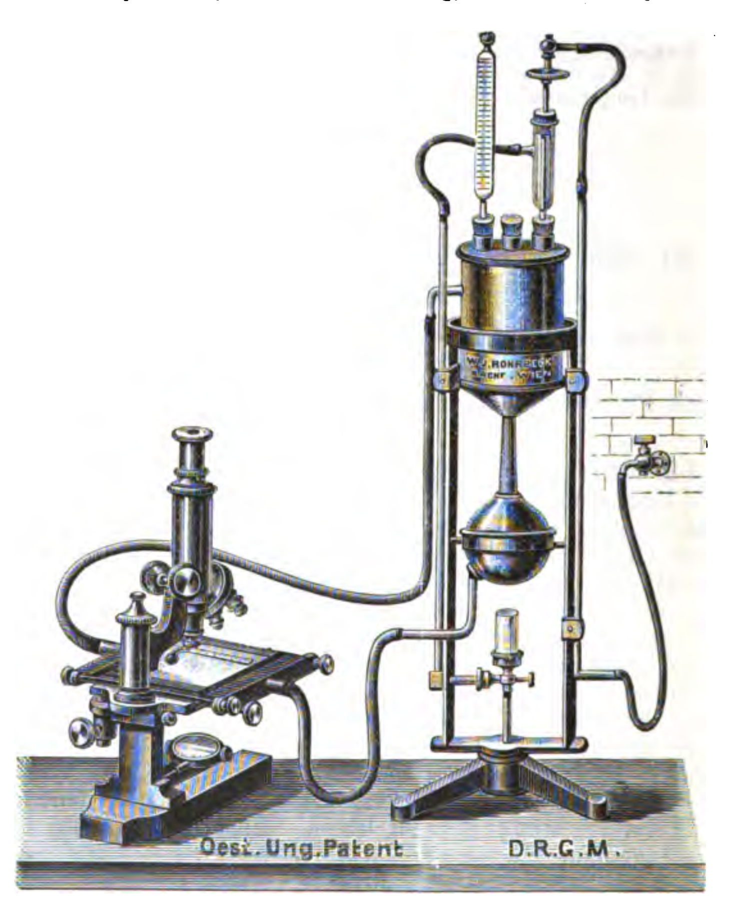
Mit 1 Figur.

In Bd. XXIII des Centralbl. f. Bakt. etc. habe ich einen neuen elektrisch heizbaren Objekttisch beschrieben. Die Vorteile dieses Tisches waren darin gelegen, daß bei dem mittels Elektricität geheizten und regulierten Objekttische eine bestimmte Temperatur rasch zu erreichen war und daß die eingestellte Temperatur konstant auf derselben Höhe gehalten werden konnte. Die Temperaturschwankungen betrugen 0,1 °. Dieser Tisch, der sich bei unseren Arbeiten sonst gut bewährte, hatte nur den Nachteil, daß wegen der Feinheit der Heizvorrichtung oft Störungen im Mechanismus eintraten. Es kam ab und zu bei der Einschaltung an die Leitung zu Kurzschlüssen, wodurch die Heizvorrichtung zerstört wurde und wieder neu ersetzt werden mußte. Weitere Versuche, eine andere Art Heizung zu konstruieren, führten bisher zu keinem Resultate, so daß wir auf die elektrische Heizung verzichten mußten und nach einer anderen Heizvorrichtung gesucht haben. Unseren Anregungen folgend, hat Herr Ingenieur Ehmann (Firma Rohrbeck's Nachfolger, Wien) einen neuen heizbaren und regulierbaren Objekttisch konstruiert, dessen Beschreibung und Arbeitsleistung im Folgenden mitgeteilt werden soll.

Der Apparat (s. Fig.) besteht aus einem hohlen Objekttisch aus Glas und dem Heizgefäß. Das Heizgefäß besteht aus dem unteren Siedegefäß und dem oberen cylindrischen Wasserreservoir. Das Heizgefäß und Siedegefäß ist mittels Schlauches mit dem Objekttisch verbunden. Dieses geschlossene Gefäßsystem wird mit ausgekochtem, destilliertem Wasser vorsichtig gefüllt. Durch die unter dem Siedegefäße befindliche Gasflamme wird das im Siedegefäße vorhandene Wasser erwärmt und steigt vermöge seines leichteren spezifischen Gewichtes durch das enge, konische Verbindungsrohr rasch in das obere Reservoir. Dem

1) Demonstriert in der morph.-physiol. Gesellschaft im Mai 1901.

aus dem Siedegefäße rasch in die Höhe steigenden Wasser folgt das im Objekttisch zunächst und dann das im Reservoir befindliche kalte Wasser nach. Das Wasser wird also in Cirkulation gesetzt und würde so lange cirkulieren, bis alle Wasserteilchen gleichmäßig erwärmt wären. Durch diese gleichmäßige Temperierung der ganzen Wassersäule würde das treibende Prinzip erschöpft werden und die Cirkulation würde dadurch aufhören oder verlangsamt werden müssen. Dadurch aber, daß das System (die Schlauchleitung, der hohle Objekttisch, die



Oberfläche des Wassers) einer steten, gleichmäßigen Abkühlung durch die umgebende kalte Luft ausgesetzt ist, bleibt die Ungleichmäßigkeit der Temperierung der verschiedenen Schichten des Wassers im System bestehen, das im Siedegefäße befindliche Wasser wird durch die Gasflamme erhitzt und kann in das kältere, überstehende Wasser wieder aufsteigen. Wir hätten also mit diesem Mechanismus eine konstante Speisung des Objekttisches mit warmem Wasser erzielt. Der Vorteil dieser Vorrichtung gegenüber den älteren Systemen wäre darin gelegen, daß eine konstante, erwärmte Wasserquelle konstant tagelang den Tisch mit warmem Wasser versorgen kann. Die Regulierung der Temperatur dieses Tisches erfolgt in der Weise,

daß man in das obere Wasserreservoir einen beliebigen Wärmeregulator einsetzt, der, in die Gasleitung eingeschaltet, die Flamme des Mikrobenbrenners reguliert. Durch die Einstellung des Wärmeregulators auf eine bestimmte Temperatur kann das Wasser im Reservoir die gewünschte Temperatur erreichen und konstant auf derselben gehalten werden. Die Ablesung der Temperatur geschieht durch ein im Reservoir befindliches Thermometer. Nachdem Versuche ergeben haben, daß bei Einstellung auf eine bestimmte Temperatur die Temperaturen des Wassers im Reservoir und im Objekttisch nicht gleich sind, trotzdem aber ganz konstante Temperaturdifferenzen (ca. 8°) aufweisen, empfiehlt es sich, den Regulator nach dem im Objekttisch eingesetzten Thermometer auf die gewünschte Temperatur einzustellen. Unsere Beobachtungen, die wir durch Tage fortgesetzt haben, lehren uns, daß die Temperaturen des Tisches bis auf Schwankungen von 1° ganz konstant geblieben sind. Der Objekttisch selbst besteht aus einem hohlen, planparallelen Gefäße, welches beiderseits eine Metallfassung trägt. Durch seitliche Schrauben hält die Metallfassung mittels einer Kautschukdichtung den Tisch wasserdicht. Durch Lockerung der Schrauben läßt sich der Tisch zerlegen und leicht reinigen.

Das zu untersuchende Objekt liegt auf dem heizbaren Glastisch und kann sowohl mit Trocken- als auch Immersionslinsen untersucht werden. Messungen (Thermometermessungen), die mit flach anliegenden eigens konstruierten Thermometern angestellt wurden, haben ergeben, daß die Temperaturdifferenz zwischen Temperatur im Tische selbst und im Objektträger 4° betragen. Auf Grund des Schmelzpunktes des chemisch reinen Menthols (Schmelzpunkt bei 37°) lassen sich ganz genaue Temperaturwerte des Objektträgers feststellen. Es ist notwendig, die Temperatur im Tische entsprechend höher zu stellen, um die gewünschte Temperatur im zu untersuchenden Objekte zu erreichen. Die einmal angestellte Temperatur bleibt dann auch im Objektträger ebenso konstant wie die im Objekttisch und auch die im Wasserreservoir.

Ueber einen Apparat zur bakteriologischen Wasserentnahme[1].

[Aus dem staatl. serotherapeut. Institute in Wien (Vorstand: Prof. R. Paltauf).]

Von Privatdocent Dr. **Rudolf Kraus.**

Mit 2 Figuren.

Im Folgenden sei ein Apparat zur Entnahme von Wasserproben aus bestimmten Tiefen für bakteriologische Untersuchungen beschrieben, der sich uns bei Wasseruntersuchungen sehr gut bewährt hat. Der Apparat ist nach unseren Angaben von Herrn Ingenieur Ehmann (Firma Rohrbeck's Nachf. in Wien) konstruiert. Der Apparat besteht aus einer metallenen Schutzhülse zur Aufnahme des Glaskölbchens *C*. Die Schutzhülse selbst besteht aus einem unteren Gehäuse

---

1) Demonstriert in der Gesellschaft der Aerzte in Wien am 20. Mai 1898.

zur Aufnahme des Kölbchens und aus einem einschraubbaren Deckel, der an seinem oberen Pole eine Bohrung für einen durchbohrten Kautschukpfropfen *E* trägt. Das Glaskölbchen wird zunächst mit seinem Halse durch den Kautschukpropf geschoben und erst dann mit dem Deckel an das untere Gehäuse angeschraubt. Außer dieser Hülse zur Aufnahme des Kölbchens besteht der Apparat aus einer Schneidevorrichtung. Die letztere trägt ein in einem Schlitten gleitendes, federndes Messer *A*. Das Messer kann durch eine Arretvorrichtung an dem einen

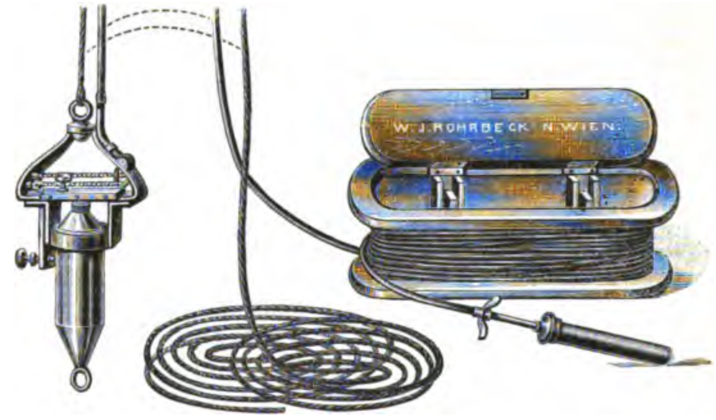


Fig. 1.

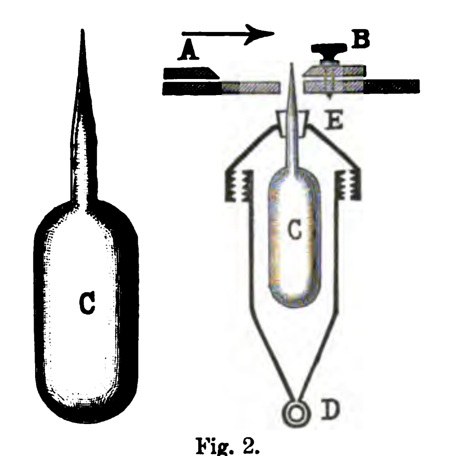


Fig. 2.

Ende des Schlittens arretiert werden. Die Auslösung der Arretiervorrichtung geschieht durch einen Stift, der durch den Luftdruck das arretierte Messer freimacht.

Der Stift, welcher die Arretierungsvorrichtung des Messers auslöst, wird dadurch in Funktion gesetzt, daß an die Kanüle, in der sich der Stift Ventil befindet und die an der Schneidevorrichtung angebracht ist, ein langer Schlauch angesetzt wird, der an seinem anderen Ende eine kleine Kompressionspumpe trägt, durch welche der notwendige Druck erzeugt werden kann.

Der beschriebene Apparat wird nun in folgender Weise gehandhabt: Das Kölbchen *C*, welches fast luftleer gemacht ist, kommt in das Schutzgehäuse, wobei die Spitze des Halses den Kautschukpropf überragen muß. Das Schutzgehäuse wird dann an die Schneidevorrichtung angeschraubt und zwar so weit, daß die Spitze des Kölbens die Ebene des Schlittens der Schneidevorrichtung *A* und *B* ca. 5 mm überragt. In dieser Lage wird das Schutzgehäuse mittels einer seitlichen Schraube fixiert. Vorher muß jedoch noch das Schneidemesser *A* gestellt werden, d. h. es wird das an einer Feder angebrachte kleine Messer angespannt und am einen Ende des Schlittens arretiert, wodurch die Feder stark gespannt wird. Ist das geschehen,

so ist der Apparat funktionsbereit und kann in bestimmte Tiefen gesenkt werden. An einem Seile, welches an einem Ringe der Schneidevorrichtung angebracht ist, wird der Apparat ins Wasser gebracht und nachdem er die gewünschte Tiefe erreicht hat, genügen 2 oder 3 Hube der Pumpe, um den Stift niederzudrücken.

Durch die Verschiebung des Stiftes wird die Arretierungsvorrichtung des Messers ausgelöst, das angespannte Messer *A* schnellt im Schlitten gegen das Messer *B* und schneidet die Spitze des Kölbchens *C* ab. Das Wasser dringt in das evakuierte Kölbchen, ohne das Kölbchen vollfüllen zu können. Der Apparat kann jetzt aus dem Wasser herausgezogen werden, wobei kein Wasser einer oberen Schicht mehr einfließen kann. Der Verschluß der Kölbchen kann entweder durch Zuschmelzung erfolgen oder durch Siegellack.

Beim Verarbeiten wird der Hals mit einem Glasmesser angeschnitten, abgebrochen und das Wasser mit einer Pipette entnommen.

Ueber Versuche mit bakteriellem Lab und Trypsin.

[Aus dem kgl. Institut für experimentelle Therapie (Direktor: Geh. Rat P. Ehrlich).]

Von Dr. **Adam Loeb** in Frankfurt a. M.

Nachdem M. Neisser und Wechsberg (1) das Phänomen der Komplementablenkung bei baktericiden Reagenzglasversuchen gezeigt und erklärt hatten, hat sich das Interesse solchen, auf den ersten Blick unregelmäßig verlaufenden Reihen bei Reagenzglasversuchen mehr und mehr zugewandt. So beschrieben Bail (2), Eisenberg und Volk (3), Shiga (4), R. Kraus und Freiherr v. Pirquet (5) sowie Eisenberg (6) derartige unregelmäßige Reihen bei Agglutininen und Präcipitinen. Das Phänomen dieser unregelmäßigen Reihen besteht in folgendem: Zu der gleichen Menge des einen reagierenden Stoffes kommen abfallende Mengen des anderen; dabei erweisen sich die größten Mengen der wirksamen Substanz weniger wirksam als die kleineren. Auf die Erklärung dieser Erscheinungen bei den verschiedenen erwähnten Versuchen kann hier nicht eingegangen werden; nur soviel sei bemerkt, daß der Mechanismus dieser Erscheinung bei den Agglutininen und Präcipitinen verschieden ist von dem der Komplementablenkung bei baktericiden Reagenzglasversuchen.

Seit einiger Zeit mit dem Studium der Fermente des Staphylococcus quadrigeminus Czaplewski beschäftigt, stieß ich nun ebenfalls auf eine derartige unregelmäßige Reihe, deren Mechanismus wieder ein anderer ist.

Daß der Staphylococcus quadrigeminus Lab bildet, war aus dem Resultate der Milchkultur zu ersehen: Nach 24 Stunden war die Milch bei erhaltener alkalischer Reaktion geronnen. Daß dieses Labferment nicht direkt an die Bakterienzelle gebunden, sondern diffusionsfähig ist, ging aus dem Resultate der Züchtung auf einer Milchagarplatte nach Eijkmann (7) hervor. Wurde nämlich auf dieser modifizierten Beijerinck-Platte der Staphylococcus quadri-

geminus ausgestrichen, so war nach 24 Stunden folgendes Bild entstanden: Unmittelbar um den Impfstrich war eine helle Zone sichtbar, als Ausdruck der Wirkung eines tryptischen Fermentes, und peripher davon eine dunkle Zone, die augenscheinlich ausgefälltem Caseïn entsprach (Eijkmann l. c.). Aus diesem Versuche, den man jedesmal in völlig gleicher Weise reproduzieren kann, geht einmal hervor, daß ein diffundierendes Lab produziert wird, und zweitens, daß ein gewisser Antagonismus zwischen Lab und tryptischem Ferment besteht, derart, daß in der centralen Zone der Trypsinwirkung eine Labung nicht sichtbar ist.

Ich suchte nun das lösliche Lab in dem Kulturfiltrate einer 7-tägigen Bouillon nachzuweisen, indem ich fallende Mengen des Filtrates zu 2 ccm Chloroformmilch zusetzte und auf 4 ccm mit physiologischer Kochsalzlösung auffüllte, die Röhrchen nach der Morgenroth'schen (8) Methode in den Eisschrank und dann in den Thermostaten brachte. Dabei zeigte sich, wie aus folgender Tabelle hervorgeht, eine unregelmäßig verlaufende Labungsreihe.

Tabelle 1.

Kulturfiltrat	Labwirkung
2,0 ccm	0
1,0 „	0
0,75 „	0
0,5 „	0
0,25 „	Spur
0,1 „	+
0,075 „	++
0,05 „	+++
0,025 „	0
0,01 „	0

Die ersten Röhrchen mit den größten Filtratmengen gaben keine Spur einer Labung, in den folgenden wurde Labung beobachtet, die in den letzten wieder fehlte. Da diese Erscheinung vielfach bei verschiedenen Filtraten beobachtet wurde, so mußte nach einer Erklärung gesucht werden. Freilich zeigten nicht alle untersuchten Filtrate diese Unregelmäßigkeit, sondern manche Reihen verliefen, wie folgende Tabelle beweist, völlig regelmäßig.

Tabelle 2.

Kulturfiltrat	Labwirkung
1,0 ccm	+++
0,75 „	+++
0,5 „	+++
0,25 „	++
0,1 „	0
0,075 „	0
0,05 „	0
0,025 „	0

Die Frage nach der Natur des die Unregelmäßigkeit bedingenden Körpers ließ sich nun in dem Sinne entscheiden, daß er durch Erwärmen auf 60° während einer Stunde zerstört werden konnte; Zugabe eines derartigen inaktivierten Filtrates zu einer an sich labenden Dosis bewirkte nämlich keine Labhemmung mehr.

Die Untersuchung einer Reihe von verschiedenen Kulturfiltraten auf das Ausbleiben der Labung bei den großen Dosen ergab, daß es auf den Labgehalt des Filtrates weniger ankommt als auf den Gehalt an tryptischem Ferment (der nach einer Modifikation der Fermi-Methode

bestimmt wurde). Von 2 Filtraten mit gleichem Labgehalt zeigt dasjenige die Erscheinung der unregelmäßigen Reihe, dessen gleichzeitiger Trypsingehalt ein hoher ist. Da also die Verschiedenheit im Gehalte an tryptischem Ferment das Phänomen der unregelmäßigen Reihen bedingte, kam ich zur Ueberzeugung, daß das tryptische Ferment in gewissem Sinne ein Antagonist des Labfermentes ist, wie das ja auch aus der Züchtung auf den Milchplatten hervorging.

Daß es aber die absolute Menge des tryptischen Fermentes war, von der das Eintreten oder Ausbleiben der unregelmäßigen Reihen abhing, läßt sich aus folgendem Versuche entnehmen:

In eine Reihe Röhrchen kamen von einem Filtrate A je 1 bezw. 0,5 und 0,25 ccm; das Filtrat A zeigte die Erscheinung der unregelmäßigen Reihe, so daß bei den angewandten Mengen desselben jede sichtbare Wirkung ausblieb. Um nun das Verhältnis Lab zu tryptischem Ferment zu Gunsten des Labs zu verschieben, wurden von einem Filtrate B, das etwas weniger Lab und sehr viel weniger tryptisches Ferment als A enthielt, verschiedene Mengen zugegeben. Wie die Tabelle aber zeigt, bewirkte der Zusatz einer an sich labenden Dosis von B nicht das Auftreten einer Labung.

Tabelle 3.

	A 1,0	A 0,5	A 0,25	—
B 1,0	0	0	0	+
B 0,5	0	0	0	+
B 0,25	0	0	0	+
—	0	0	0	0

Die absolute Trypsinmenge hatte also auch hier den Eintritt der Labung verhindert. Das Gleiche läßt sich auch für gewöhnliches tierisches Lab nachweisen, wenn man z. B. zu 1 ccm des Filtrates A erhebliche Mengen einer starken Kälberlablösung zugiebt.

Dadurch wird es jetzt auch klar, weshalb erst eine geringere Filtratmenge bei den Reihenversuchen Labung bewirkt: Während bei der Verdünnung des Filtrates die Relation von Lab zu tryptischem Ferment naturgemäß sich nicht ändern kann, sinkt der absolute Gehalt an tryptischem Ferment.

Noch auf einem zweiten Wege gelingt es, die Störung durch das tryptische Ferment auszuschalten, nämlich durch die Verwendung von Antifermenten, die für das Lab- und tryptische Ferment des Staphylococcus quadrigeminus in großer Menge in jedem Serum enthalten sind. Wenn man eine wegen zu starken Trypsingehaltes an sich nicht labende Dosis in Gegenwart fallender Serummengen auf Milch einwirken läßt, so tritt von einer gewissen Serumverdünnung an starke Labung auf, die in den Rohren mit weniger Serum wieder ausbleiben kann (s. Tabelle 4 p. 474).

Die einfache Erklärung dieser unregelmäßigen Reihe ist die: das Ausbleiben der Labung in den ersten Röhrchen ist durch das im Serum enthaltene Antilab[1]) bedingt; in den nächsten Röhrchen überwiegt

1) Während nach Morgenroth Ziegenserum kein oder nur Spuren von Antilab gegen tierisches Lab enthält, wurden von 1 ccm des angewandten Ziegenserums 250 einfach labende Dosen meines Filtrates eben neutralisiert, während Pferdeserum meist doppelt so wirksam war. Daraus geht eine Verschiedenheit der haptophoren Gruppen des tierischen und des vorliegenden Bakterienlabes hervor.

Tabelle 4.

	ccm Serum	Labung
Filtratmenge in allen Röhrchen 1 ccm	1,0	0
	0,5	0
	0,25	0
	0,1	0
	0,05	0
	0,025	+++
	0,01	+++
	0,005	+
	0,0025	Spur
	0,001	Spur
	0,0005	0
	0,00025	0

Filtrat labt erst von 0,25 ab. Inaktives Ziegenserum an sich bei keiner Verdünnung labend. — Milch 2 ccm, Auffüllung mit physiolog. Kochsalzlösung auf 4 ccm.

schon das Lab über das Antilab, während das tryptische Ferment entweder total oder doch soweit abgesättigt ist, daß die absolute Menge zu gering ist, um die Labung zu stören. Bei weiterer Abnahme des Serums steigt wieder die absolute Menge des tryptischen Fermentes, und die Verhältnisse liegen wie bei den Rohren ohne Serumzusatz. Der Zusatz von Serum hat hier also eine scheinbare „Verstärkung“ des Labes zur Folge.

Bei der weiteren Untersuchung des Phänomens der unregelmäßigen Reihen zeigte sich aber, daß es nur bei der Morgenroth'schen Versuchsanordnung der Labeinwirkung in der Kälte auftrat. Wurde nämlich das Milchfiltratgemisch mit Umgehung des Eisschrankaufenthaltes sofort der Erwärmung ausgesetzt, so trat auch in den Röhrchen mit maximalem Filtratgehalte volle Labung auf. Dasselbe Ergebnis hatte man aber auch bei den im Eisschranke vorbehandelten Proben, wenn man sie nicht im Brütschranke, sondern bei höherer Temperatur, z. B. 45° C, oder durch Einfrierenlassen [1]) zur Labung brachte.

Auch nach der Seite der Gerinnungszeiten hin zeigten unsere Filtrate Abweichungen von dem Verhalten reiner Lablösungen. Während diese dem Gesetze folgen, daß die Labungszeit der Labmenge umgekehrt proportional ist, und nach Einwirkung in der Kälte die sichtbare Fällung in kurzer Zeit erfolgen lassen — nach Fuld (9) in wenigen Minuten —, weichen unsere Filtrate von dem Verhalten reiner Lablösungen insofern ab, als sie zwar dem Zeitgesetze der Labung folgten, daß aber nach ihrer Einwirkung in der Kälte keine prompte Gerinnung in allen Röhren auftrat; vielmehr brauchten größere Labmengen längere Zeit zur Gerinnung als kleinere.

Tabelle 5.

Filtratmenge	25° C	32° C	37° C	45° C
1 ccm	überhaupt nicht	52'	35'	sofort
1/2 "	115'	15'	15'	sofort
1/4 "	15'	3'	3'	sofort

1) Läßt man ein Filtratmilchgemisch sofort nach der Mischung einfrieren, so bleibt eine Labung aus; diese tritt erst dann ein, wenn das Lab oberhalb 0° einige Zeit auf die Milch einwirken konnte. Demnach würde das Einfrieren nur die Käseausfällung, nicht die Labbindung bewirken.

Die Tabelle giebt das Auftreten der ersten Spur Labung in Minuten an; es ist ihr ferner zu entnehmen, daß mit steigender Temperatur die Zeit bis zum Eintritt sichtbarer Labung abnimmt.

Stellt man die wesentlichsten gefundenen Thatsachen noch einmal zusammen, so sind dies folgende:

Werden die Filtratmilchgemische im Eisschranke gehalten und dann Temperaturen bis 36° C ausgesetzt, so erhält man die unregelmäßigen Reihen; diese bleiben aber aus, wenn man die Präcipitation durch rasches Erwärmen auf höhere Temperatur oder durch Einfrierenlassen herbeiführt. Frisch zusammengegossene Filtratmilchgemische geben bei mittleren und höheren Temperaturen stets regelmäßige Labung.

Daraus folgt unmittelbar, daß während des Eisschrankaufenthaltes die Milch der Gemische eine Veränderung durchgemacht hat; durch Morgenroth wissen wir ja schon, daß das Lab dabei an das Caseïn verankert wird. Die gefundenen Thatsachen berechtigen nun zu der Annahme, daß das Trypsin sich in gleicher Weise verhält. Erst mit der Annahme einer Verankerung des Trypsins und des Labes an das Caseïn in der Kälte lassen sich die unregelmäßigen Reihen erklären. Es wird dann in der Kälte oder beim langsamen Anwärmen des Gemisches das Caseïn vor Eintritt der Präcipitation durch das Trypsin derart verändert, daß eine Ausfällung nicht mehr möglich oder erschwert ist; das erfolgt wahrscheinlich durch den Abbau des Eiweißes; es ist aber auch die Möglichkeit nicht ganz von der Hand zu weisen, daß schon die Verankerung des Trypsins das Caseïn für Lab weniger empfänglich macht. — Einmal ausgefällter Käse wird, wie wiederholt beobachtet wurde, von einer Trypsinmenge, die bei geeigneter Versuchsanordnung die Ausfällung überhaupt verhindert hätte, hinterher nicht mehr vollständig aufgelöst.

Unregelmäßige Labungsreihen erhält man auch mit anderen Bakterienfiltraten, z. B. mit dem einer von Herrn Kollegen Lipstein aus einer Pyonephrose isolierten Proteus-Art; ebenso geben Pankreasextrakte und das Pankreatin des Handels die unregelmäßigen Reihen in ausgesprochenem Maße, da in diesen beträchtliche Mengen von Lab enthalten sind, die bei der gewöhnlichen Versuchsanordnung nur durch die große Menge des tryptischen Ferments verdeckt werden. Prüft man aber abfallende Mengen von Pankreatinlösungen auf ihr Labvermögen oder wendet man (antifermenthaltiges) Serum an, so erhält man auch hier Labung in einem oder mehreren Gläsern. — Gewöhnlich findet man die Angabe, daß das Pankreatin die Milch nicht labe, sondern in einer eigentümlichen Weise verändere, die Kühne (citiert nach Oppenheimer) als Metacaseïn bezeichnete. Derartige Milch gerinnt erst beim Kochen und giebt mit Kochsalz einen Niederschlag; ebenso verhalten sich nun bei dem Bakterienfiltrate die Milchproben, die wegen zu großen Filtratgehaltes eine eigentliche Gerinnung nicht erfahren hatten.

Herrn Prof. M. Neisser sei für die fördernde Unterstützung bei dieser Arbeit mein verbindlichster Dank ausgesprochen.

Litteraturverzeichnis.

1) Neisser u. Wechsberg, Münch. med. Wochenschr. 1901. No. 13.
2) Bail, Arch. f. Hygiene. Bd. XLII. No. 4.
3) Eisenberg u. Volk, Zeitschr. f. Hyg. Bd. XL. 1902.
4) Shiga, Zeitschr. f. Hyg. Bd. XL. 1902.

5) Kraus, R. u. Freiherr v. Pirquet, Centralbl. f. Bakt. etc. Abt. I. Bd. XXXII. 1902.
6) Eisenberg, Centralbl. f. Bakt. etc. Abt. I. Bd. XXXI. 1902.
7) Eijkman, Centralbl. f. Bakt. etc. Abt. I. Bd. XXIX. 1901.
8) Morgenroth, Centralbl. f. Bakt. etc. Abt. I. Bd. XXVI. 1899 u. Bd. XXVII. 1900.
9) Fuld, Hofmeister's Beiträge. Bd. II.
10) Oppenheimer, Die Fermente. 1900.

Beitrag zum bakteriologischen Nachweise von Trinkwasserverunreinigungen anlässlich infektiöser Erkrankungen.

[Aus dem Sanitätsdepartement der k. k. Landesregierung in Klagenfurt.]

Von k. k. Landesregierungsrat Dr. **Meusburger,** Landessanitätsreferent,
und
k. k. Sanitätsassistent Dr. **Rambousek,** em. Assistent der Hygiene.

Die Frage der Infektiosität eines bestimmten Trinkwassers tritt an die amtlichen Sanitätsorgane außerordentlich häufig heran; meist soll diese Frage schnell und sicher entschieden werden, nachdem es sich in vielen Fällen um die weitere Benutzbarkeit der betreffenden Wasserversorgungsanlage handelt und es nicht angeht, ohne triftige Gründe mit der Sperrung einer solchen Anlage, wodurch Konsumenten und Besitzer unter Umständen nutzlos geschädigt würden, vorzugehen. — Meist ist es das Auftreten von Typhus, welches eine schnelle und sichere Entscheidung über die spezielle Frage, ob das Trinkwasser die Infektionsquelle sei, fordert.

Zweck dieser Zeilen ist es, auf die Einfachheit und Zweckmäßigkeit der von Parietti[1]) ursprünglich angegebenen Methode hinzuweisen, welche uns in vielen praktischen Fällen gedient hat, und welche sich durch ihre leichte Durchführbarkeit auch zum Gebrauche seitens der amtsärztlichen Organe am Lande empfiehlt; denn es genügt, wenn man gewöhnliche Bouillon, Gelatine, bakteriologische Pipetten und Petri-Schalen steril zur Hand hat.

Diese Methode wird folgendermaßen ausgeführt: Drei Bouillonröhrchen mit circa 5 ccm Bouillon werden mittels einer 4-proz. Salzsäure und 5-proz. Karbolsäure („Parietti's Säure") enthaltenden Lösung in der Weise angesäuert, daß das erste Röhrchen mit 3, das zweite mit 6 und das dritte mit 9 Tropfen von diesem Säuregemische versehen werden; man fertigt sich 3 Serien solcher Röhrchen (im ganzen also 9 Eprouvetten) an; der ersten Serie werden 4 Tropfen (= ca. 0,2 ccm), der zweiten 8 Tropfen (= ca. 0,4—0,5 ccm), der dritten 12—16 Tropfen (ca. 1 ccm) des zu untersuchenden Wassers hinzugefügt. Die Röhrchen sollen dann 24—48 Stunden im Thermostaten verharren.

Nach Parietti's Angaben deutet eine Trübung der Bouillon auf Vorhandensein von Typhusbacillen, welche dann aus der getrübten Bouillon durch die gewöhnliche Plattenmethode herausgezüchtet werden können.

---

1) Parietti, Metodo di ricerca del bacillo del tifo nelle acque potabili. (Rivista d'igiene e sanità pubblica). Anno I. No. 11. Roma 1890.

Es ist klar, daß es sich bei dieser Methode um eine Anreicherung der fraglichen Bacillen handelt; allerdings wurde dieser Vorschlag Parietti's zum Zwecke der Isolierung von Typhusbacillen und zwar zu einer Zeit gemacht in welcher die den Thyphusbacillen nahezu oder auch vollkommen gleich wachsenden Coli-Bacillen, diese normalen Darmparasiten, noch nicht so allgemein bekannt waren, um mit dem Eberth'schen Bacillus verglichen werden zu können, wie heute [1]).

Die Parietti'sche Methode wurde bald von zahlreichen anderen Isolationsvorschlägen für Typhuskeime zurückgedrängt, wohl auch ob der häufigen Mißerfolge; es gelang eben nicht Typhusbacillen zu isolieren, sondern es wuchsen die nicht erwünschten Coli-Bacillen auf. In der neueren Zeit wurde die Methode von Hankin [2]) wieder aufgefrischt und modifiziert, aber auch wesentlich kompliziert, um sie auf Typhusbacillen anwendbar zu machen. — Wir wollen jedoch bei dem ursprünglichen Parietti'schen Verfahren bleiben und dessen Wert für Wasserfragen beleuchten.

Worauf beruht denn die Parietti'sche Methode? Sie ist — wie oben erwähnt — eine Anreicherungsmethode und stützt sich auf die Resistenz der zu isolierenden Keime gegen die Acidität des Nährbodens. Es ist durch zahlreiche experimentelle Arbeiten [3]) erwiesen, daß das B. coli eine viel größere Säurefestigkeit besitzt als der B. typhi; welchem letztere Eigenschaft in quantitativ viel geringerem Maße eigen ist. — Sobald daher die säurefesteren Coli-Bacillen neben den Typhuskeimen im Wasser vorhanden sind, werden auf sauerem Nährboden letztere überwuchert. Daher die Mißerfolge, wenn man mit dieser Methode Typhuskeime sucht.

Sobald es sich um eine Trinkwasseruntersuchung handelt, so bleibt es zur Beurteilung der Genießbarkeit des Wassers natürlich vollkommen gleichgiltig, ob Coli-Bacillen oder Thyphuskeime in demselben konstatiert wurden; denn falls man auch nur Coli-Bacillen findet, muß man das betreffende Wasser als mit tierischen oder menschlichen Exkrementen verunreinigt, also als ungenießbar bezeichnen. Auch im Falle eines Infektionsverdachtes (mit Typhusbacillen oder Dysenterie) genügt es, Coli-Bacillen im Wasser nachgewiesen zu haben, um sagen zu können, daß hier die Infektionsmöglichkeit mit eventuell gleichzeitig vorhandenen, nicht entdeckten, überwucherten oder durch die große Acidität des Bodens im Wachstume gehemmten Typhuskeimen vorhanden sei; denn die Kommunikation mit irgend einer Infektionsquelle ist erwiesen (Kanal, Senkgrube, Dünger etc.) [4]).

Der größte Vorteil der Anreicherung mittels Parietti's Methode ist der Umstand, daß durch den Säuregrad des Nährbodens die verflüssigenden Keime in ihrer Entwickelung meist gänzlich gehemmt werden, so daß oft, während die Zählplatten gänzlich verflüssigt werden, wodurch eine Aufdeckung der Coli-ähnlichen Keime unmöglich wird, durch die Parietti'sche Methode aus demselben Wasser geradezu

1) B. coli zuerst beschrieben von Escherich 1886. B. typhi dagegen bereits 1880 (durch Eberth).

2) Hankin, Centralbl. f. Bakt. 1899. p. 558.

3) Vergl. auch Rambousek, Archiv f. Hygiene. Bd. XXXVIII. 1900. p. 383 (dort auch Uebersicht der einschlägigen Litteratur), ref. Centralbl. f. Bakt. Bd. XXVIII. p. 883.

4) Der Nachweis einer solchen Kommunikation kann insbesondere auch durch die Saprolprobe erhärtet werden. (Gesundheit. 1900. No. 18; ref. Monatsschr. f. öffentl. Gesundheitspfl. 1901. No. 4. S. 98.)

Reinkulturen Coli-ähnlicher Keime gewonnen werden, falls diese Methode in korrekter Weise durchgeführt wurde.

Es muß darauf hingewiesen werden, daß die Probe vereinfacht werden kann, indem man diejenigen Mischungen, welche einerseits wenig Wasser und viel Säure enthalten, weglassen kann, da diese (wie z. B. 9 Tropfen Parietti auf 0,2 Wasser) meist negativ ausfallen und ebenso diejenigen Proben, welche viel Wasser und wenig Säure enthalten, weil diese nur zu oft positiv ausfallen und dann entweder überhaupt andere Bakterien, als Coli-Keime liefern oder keine Reinkulturen von Coli-Bacillen ergeben. Folgendes Schema gewährt eine Uebersicht:

$$\text{I. Serie:}\quad \frac{3\,P}{0{,}2}\quad \left(\frac{3\,P}{0{,}5}\right)\quad \left(\frac{3\,P}{1{,}0}\right)$$

$$\text{II. Serie:}\quad \frac{6\,P}{0{,}2}\quad \left(\frac{6\,P}{0{,}5}\right)\quad \frac{6\,P}{1{,}0}$$

$$\text{III. Serie:}\quad \left(\frac{9\,P}{0{,}2}\right)\quad \left(\frac{9\,P}{0{,}5}\right)\quad \frac{9\,P}{1{,}0}$$

P = Tropfen der Parietti'schen Lösung; im Nenner des Bruches stehen die zugesetzten Wassermengen in Kubikcentimetern. Die eingeklammerten Zusammenstellungen können aus den obenangeführten Gründen entfallen.

In Ermangelung des Thermostaten werden die Proben im warmen Zimmer in der Nähe des Ofens oder Herdes gehalten; dann ist jedenfalls eine Inkubationsdauer von 48 Stunden bis 3 Tagen abzuwarten, ehe man im negativen Sinne entscheidet.

Welche Proben sind nun, falls deren mehrere positiv ausfallen, d. h. falls sich mehrere Röhrchen trüben, zur weiteren Untersuchung, d. h. zum Plattengießen zu verwenden? Hierzu eignen sich naturgemäß diejenigen am besten, welche bei großem Säuregehalte mit nur wenig Wasser beschickt wurden und doch positiv ausgefallen d. h. getrübt worden sind. — Wenn dann die Plattenkulturen faktisch Coli-ähnliche Keime ergeben haben, ist dennoch an diesen eine weitere Erprobung durch die gebräuchlichen diagnostischen Methoden geboten. Man untersucht, um schnell und einfach vorzugehen, am besten: zuerst durch ein gefärbtes mikroskopisches Präparat, ob faktisch Bacillen vorliegen (und zwar Coli-ähnliche) und eventuell im hängenden Tropfen, ob diese Bacillen beweglich sind; fällt diese Untersuchung positiv aus, dann impft man in einen sterilisierten traubenzuckerhaltigen Nährboden und in sterilisierte Milch; tritt Gasentwickelung und Milchgerinnung ein, dann kann man die Keime mit an Gewißheit grenzender Wahrscheinlichkeit als Coli-Keim ansprechen. Diese Proben können durch Bruttemperatur beschleunigt werden. — Im allgemeinen wurde jedoch die Erfahrung gemacht, daß ein Wasser, welches auch nur säurefeste Bakterien enthielt, selbst wenn sie sich nicht ganz in ihren Eigenschaften mit B. coli decken, immer als „verdächtig" zu bezeichnen ist.

Nach dem Gesagten ist daneben der ganze Verlauf der Probe, kurzgefaßt, folgender:

1) Aufstellung der Proben (im Thermostaten oder am warmen Orte);

2) nach 24 (bezw. 48) Stunden: Trübung beim positiven Verlaufe, Auswahl, Plattengießen;

3) nach weiteren 48 Stunden sind die Platten aufgegangen; man

untersucht mikroskopisch; impft im Traubenzuckeragar (oder Gelatine) und Milch;

4) nach weiteren 24—48 Stunden (je nachdem, ob Thermostat zur Verfügung) tritt im positiven Falle Gasentwickelung resp. Milchgerinnung ein.

Bei der Milchgerinnungsprobe sei hervorgehoben, daß stets eine sterile Kontrollprobe aufgestellt werden muß.

Im günstigen Falle (mit Thermostat) braucht man demnach bloß 4X24 Stunden; falls kein Thermostat zur Verfügung steht, 6X24 Stunden; demnach im Verhältnisse zur Genauigkeit des Verfahrens nur eine kurze Spanne Zeit; wobei — es sei nochmals erwähnt — das Wasser schon an sich „verdächtig" erscheint, wenn überhaupt eine Trübung eintritt; es wird demach in solch einem Falle schon nach 24 Stunden entschieden werden können, ob die betreffende Wasserversorgungsanlage nicht wenigstens interimistisch zu sperren sei. — Es sei hervorgehoben, daß uns das Verfahren bereits in vielen praktischen Fällen sehr wertvolle Dienste geleistet hat. Zu mehreren Fällen ist es gelungen, vollkommene Reinkulturen von B. coliartigen Kolonieen durch die Parietti'sche Methode zu gewinnen, trotzdem die Zählplatten, welche das betreffende Wasser lieferte, die mannigfaltigsten Keimarten in größter Menge enthielt (bis mehrere Tausend im Kubikcentimeter). — Ein solcher Fall bezieht sich auf einen Wasserlauf, aus welchem getrunken wurde und längs dessen sich eine ausgedehnte Typhusepidemie verbreitet hatte [1]). — In einem anderen Falle, in welchem uns nicht gleich Gelegenheit gegeben war, den lokalen Befund genau aufzunehmen, wurde die Parietti'sche Probe in mehreren gänzlich unabhängig und zu verschiedenen Zeiten entnommenen Proben stets positiv. Bei nachfolgender genauer Inspektion der nächsten Umgebung des Brunnens fand sich Mist und Unrat in nächster Nähe des Brunnenschachtes, welche Verunreinigungen nur zeitweilig weggeräumt wurden. In der umliegenden Wirtschaft waren Typhusfälle vorgekommen [2]). — Aus diesem letzteren Falle kann man entnehmen, daß die Parietti'sche Probe nicht nur als Bestätigung einer thatsächlich erfolgten Infektion dient, sondern auch sogar umgekehrt, auf bestehende Infektionsherde hinweist, welche bei genauer Inspektion aufgedeckt werden können.

Während des Fertigstellens dieser Abhandlung liegt wieder ein Fall vor, in welchem aus einem sehr zahlreiche Bakterien aller Sorten enthaltenden Brunnenwasser eine Reinkultur von Coli-artigen Bakterien zu züchten gelungen ist [3]). — Der Brunnen wurde selbstredend gesperrt.

Ferner sei noch eines eklatanten Falles gedacht, welchen Rambousek anderorts zu beobachten und zu untersuchen Gelegenheit hatte, wo der Einbruch eines Kanales in ein Leitungsnetz, welches ein Stadtquartier versorgte, konstatiert war. Die Parietti'sche Methode deckte damals in den meisten Verzweigungen der Leitung Coli-Bacillen auf.

Man darf freilich niemals davon absehen, gleichzeitig die Quantität der Keime überhaupt im betreffenden Wasser durch Gießen gewöhnlicher Zählplatten festzustellen. Es ist nämlich von Bedeutung, ob die Coli-artigen Mikroben die einzige Bakterienflora des betreffeeden Ge-

---

1) Oberefellach bei Villach 1901.
2) Goritschitzen bei Klagenfurt 1900/1901.
3) Stadt Klagenfurt 1901.

wässers bilden, oder ob sie einer bestimmten anders gearteten Mikrobenvegetation zugemischt sind. — Diesbezügliche vergleichende Untersuchungen in den Gewässern und Wasserversorgungsquellen einer Gegend führen zum Entdecken der wirklichen Infektionsquelle, nachdem man dann die mehr weniger normale Bakterienflora der betreffenden Gewässer kennen lernt und fremde Beimengungen leicht entdeckt.

Es muß freilich betont werden, daß man beim Ausfindigmachen einer Infektionsquelle nicht einseitig vorgehen und nur an Bakterien denken darf, welche im Wasser ihren Aufenthalt genommen haben — selbst bei Typhus, bei welchem das Wasser oft mit Recht, nicht selten aber auch mit Unrecht beschuldiget wird, muß man auch andere Infektionsmöglichkeiten berücksichtigen. — Es ist eben mit der bakteriologischen Untersuchung des Wassers allein, selbst wenn sie ein positives Resultat geliefert hat, nicht alles abgethan.

In letzterer Beziehung enthält ein Artikel in der Vierteljahrsschr f. ger. Med. (Bd. XXII. 1901. Heft 1. „die Kontagiosität des Darmtyphus“ von Dr. Bornträger beherzigenswerte Anhaltspunkte für den Amtsarzt, dessen Aufgabe es sein wird, niemals schematisch vorzugehen. sondern in jedem Falle von plötzlichem Auftreten des Typhus in einem bestimmten Orte nach den eigentlichen Entstehungsursachen zu forschen, welche, wie gesagt, nicht selten, durchaus aber nicht immer im Trinkwasser zu finden sind. — Absicht war es jedoch lediglich die Amtsärzte bei ihren vielfachen Erhebungen von Infektionskrankheiten auf eine leicht und so zu sagen allgemein durchführbare Methode der Untersuchung verdächtigen Trinkwassers (nach Parietti modifiziert) aufmerksam zu machen, nachdem dieselbe bei ihrer mehrjährigen Anwendung im hiesigen bakteriologischen Laboratorium recht befriedigende diagnostische Resultate geliefert hat.

Inhalt.

Originalmitteilungen.

Frommannsche Buchdruckerei (Hermann Pohle) in Jena.

// CENTRALBLATT
für
Bakteriologie, Parasitenkunde
und Infektionskrankheiten

Erste Abteilung:
Mediz.-hygien. Bakteriologie u. tier. Parasitenkunde

Originale

In Verbindung mit
Geh. Med.-Rat Prof. Dr. Loeffler, Prof. Dr. R. Pfeiffer, Prof. Dr. M. Braun
Greifswald Königsberg i. Pr.
herausgegeben von
Dr. O. Uhlworm in Berlin W., Schaperstr. 2/3 I

Verlag von Gustav Fischer in Jena

XXXII. Band. — Jena, den 8. Oktober 1902. — No. 7.

Preis für den Band (50 Bogen) 15 Mark. Schwierige Tafeln werden einem Bogen gleich gerechnet. — Die Nummern erscheinen zwanglos je nach dem vorliegenden Stoffe. Bei Einzelverkauf Preis für einen einfachen Druckbogen 40 Pfg., für eine Tafel 60 Pfg.

Hierzu als regelmäßige Beilage die Inhaltsübersichten der II. Abteilung des Centralblattes.

Die Redaktion des „Centralblatts für Bakteriologie und Parasitenkunde" richtet an die Herren Mitarbeiter die ergebene Bitte, etwaige Wünsche um Lieferung von besonderen Abdrücken ihrer Aufsätze entweder bei der Einsendung der Abhandlungen an die Redaktion auf das Manuskript schreiben zu wollen oder spätestens nach Empfang der ersten Korrekturabzüge direkt an den Verleger, Herrn Gustav Fischer in Jena, gelangen zu lassen.

Original-Mitteilungen.

Ueber eine von einem atypischen Colibacillus veranlasste typhusähnliche Hausepidemie hydrischen Ursprunges.

[Aus dem hygienischen Laboratorium an der Universität zu Jassy.]

Von

a. o. Prof. V. Sion, Direktor des Laboratoriums. und Prof. V. Negel, Primärarzt.

Das von Gruber und Durham festgestellte Prinzip, das von Widal unter dem Namen Serumreaktion in die tägliche Praxis eingeführt ist, gilt noch heute als das wertvollste Mittel bei der Diagnose des Abdominaltyphus. Allerdings muß zugegeben werden, daß es das nicht in jenem Maße ist, wie von Widal behauptet wurde. Bekanntlich war dessen Formel nicht nur als absolute Regel, sondern auch als von ziemlicher Einfachheit geschildert worden. Nach Widal verhielt

es sich etwa folgendermaßen: Vermengte man 1 Teil verdächtigen Serums mit 10 Teilen einer Typhusbacillenkultur, so bedeutet die eintretende Agglutination der Bacillen das sichere Vorhandensein des Abdominaltyphus. Per analogiam müßte also jeder verdächtige Bacillus, dessen Kultur durch das Serum eines Typhuskranken in demselben Verhältnis agglutiniert wird, als Typhusbacillus angesehen werden.

Allein recht bald konnte die Schwäche der Widal'schen Formel bewiesen werden. Die überaus wichtigen Arbeiten Stern's[1]) haben unter anderem in definitiver Weise festgestellt, daß in solch schwachen Verdünnungen auch andere Sera den Typhusbacillus zu agglutinieren vermögen. Man darf die Behauptung wagen, daß nur dank der so überzeugenden Arbeiten Stern's in zweifelloser Weise dargethan worden ist, daß das Vorhandensein eines Abdominaltyphus nur in jenen Fällen angenommen werden darf, in denen die Agglutination bei bedeutend stärkeren Diluationen als der von Widal angegebenen eintritt. Die von Stern angegebene Minimalgrenze von 1 Teil Serum zu 50 Teilen Kultur ist allseitig anerkannt worden. Diese Angabe findet sich auch in der letzten Curschmann'schen[2]) Arbeit als normaler Durchschnitt sowohl der eigenen wie der aus der Litteratur gesammelten Fälle.

Was nun den zweiten Teil der Widal'schen Formel anbetrifft, die Diagnose des verdächtigen Bacillus mittels des Blutes des Typhuskranken, so ist dessen Wert noch geringer, da zahlreiche spätere Arbeiten, so z. B. jene Stern's[3]), wie auch eigene Beobachtungen Widal's[4]) u. A., den Beweis erbracht haben, daß noch viele andere Bakterien mittels des Blutes Typhuskranker agglutiniert werden, und zwar in bedeutend größeren Diluationen als jener des Typhus selbst.

Insbesondere werden einige Bacillen der Coli-Gruppe besonders leicht durch das Blut Typhöser agglutiniert. Diese Thatsache beruht auf der häufigen Beobachtung Derjenigen, die öfters Gelegenheit haben, die Identifizierung der Coli- oder Typhus-ähnlichen Bacillen vorzunehmen. Auch wir hatten jüngst Gelegenheit, aus den Dejektionen eines Typhuskranken neben dem Typhusbacillus auch einen Coli-Bacillus zu isolieren. Während aber das Serum desselben Kranken den Typhusbacillus höchstens in einer Diluation von 1 : 200 agglutinierte, konnte die Verdünnung beim Coli bis auf 1 : 400 gebracht werden.

Allein wir gelangen noch weiter. Die Arbeiten von Beco[5]), Jatta[6]), Sternberg[7]) haben gezeigt, daß selbst dem von Fodor und Rigler vorgeschlagenen Mittel nur dann ein absoluter Wert zuerkannt werden darf, wenn wir über ein sehr aktives Typhusimmunserum verfügen, das imstande wäre, den Typhusbacillus in einer Verdünnung von

---

1) Stern, Diagnostische Blutuntersuchungen beim Abdominaltyphus. (Centralbl. f. innere Med. 1896. No. 49.) — Ueber Fehlerquellen der Serodiagnostik. (Berl. klin. Wochenschr. 1897. No. 11—12.)

2) Curschmann, Unterleibstyphus. (Nothnagel's spez. Pathol. u. Therapie. Bd. III. Teil 1.)

3) Stern, Typhusserum und Colibacillen. (Centralbl. f. Bakt. etc. Abt. I. Bd. XXIII.)

4) Widal und Nobécourt, Séroreaction dans une infection à paracolibacille. (Semaine méd. 1897.)

5) Beco, Bulletin de l'acad. de méd. de Belgique. 1898. — Note sur la valeur de l'agglutination par le sérum antityphique. (Centralbl. f. Bakt. etc. Abt. I. Bd. XXIV.)

6) Jatta, Experimentelle Untersuchungen über Agglutination etc. (Zeitschr. f. Hyg. Bd. XXXIII.)

7) Sternberg, Agglutination und Diagnose der Typhusbacillen. (Zeitschr. f. Hyg. Bd. XXXIV.)

mindestens 1 : 10000 zu agglutinieren. Nur in solch großen Mengen werden Coli-Typen durch Typhusimmunserum sicher nicht mehr agglutiniert, was uns also in den Stand setzt, zwischen Typhus- und Coli-Bacillen unterscheiden zu können.

Doch kehren wir zur Diagnose des Typhuskranken oder Typhusverdächtigen mittels der Widal'schen Serumreaktion zurück. Wir haben oben bemerkt, daß die untere Grenze für das Eintreten der Agglutination heute auf 1 : 50 festgestellt ist. Es entsteht nun die Frage, ob uns diese Grenze vor Fehlern zu bewahren vermag. Neben anderen Punkten wollen wir es in dieser Abhandlung versuchen, auch über diese Frage einiges Licht zu verbreiten. Thatsächlich wird heute dem positiven Resultate der Serumreaktion eine große Bedeutung zuerkannt, indem eine Agglutination im Verhältnis von 1 Teil verdächtigen Serums und 50 Teilen Kultur als sicherer Beweis dient, daß der betreffende Kranke an Typhus erkrankt sei. Das Nichteintreten der Reaktion läßt uns darüber im Zweifel; ist es doch bekannt, daß der Organismus gar nicht selten erst später reagiert.

Die von uns im Folgenden geschilderte Epidemie beweist in nicht mißzuverstehender Weise, daß selbst der positiven Serumreaktion, d. h. dem Eintreten der Agglutination in einer Verdünnung von 1 : 50, nicht ohne Vorbehalt zu trauen ist — eine Ansicht, der auch Sternberg[1]) zuneigt.

Bevor wir aber diese Frage weiter verfolgen, sei es uns gestattet, die Thatsachen zu schildern, die dieser Arbeit zu Grunde liegen.

Trotz ihrer natürlichen pittoresken Lage, die einer idealen Hygiene zugänglich wäre, läßt Jassy von diesem Standpunkte aus noch viel zu wünschen übrig. Sie ist nicht kanalisiert; die Kehrrichtswegschaffung geschieht in primitiver und durchaus unzureichender Weise; fast könnte man behaupten, daß das System „tout à l'égoût" durch das orientalische System, alles auf die Straße oder in den Hof, ersetzt ist. Auch mangelt es an einer rationellen Wasserversorgung, denn nur ein minimaler Bruchteil im Centrum der Stadt ist mit von außerhalb stammendem Wasser versehen; allein sowohl die Gewinnung dieses Wassers wie dessen Leitung ist durchaus mangelhaft und primitiv; es ist keine Sicherheit vorhanden, daß das Wasser vor Oberflächeninfiltrationen geschützt ist. Der größte Teil der Bevölkerung aber muß sich mit Brunnenwasser begnügen — der hier geschilderte Fall lehrt uns, wie diese Brunnen beschaffen sind. Die Aborte ihrerseits bestehen aus einfachen, von der Umgebung mangelhaft oder gar nicht isolierten Gruben, die nur selten und mangelhaft gereinigt werden. Es ist also kein Wunder, daß in Jassy das unterirdische Wasser, dessen sich die Bevölkerung bedient, einerseits mit dem Inhalte der Aborte, andererseits mit in Fäulnis übergegangenen oberflächlichen Ablagerungen in Verbindung steht.

Außer diesen Umständen kommt noch in Betracht das Vorhandensein einer überaus armen, zumeist jüdischen Bevölkerung, die gehäuft in unzureichenden Wohnungen lebt. Dies alles trägt dazu bei, daß hier sowohl wie in sämtlichen Ortschaften des Orients der Abdominaltyphus beinahe als permanente Endemie während des ganzen Jahres zu beobachten ist, allerdings mit manchmal recht heftigen Exacerbationen während der Herbst- und Wintermonate. Eine derartige Exacerbation

1) Sternberg, l. c.

konnten wir in diesem Jahre in Jassy beobachten. Die Epidemie begann im Juli 1901, nahm immer mehr zu und erreichte ihr Maximum in den Monaten Januar und Februar 1902, um dann zu der bei uns normalen Lage zurückzukehren.

Während der Dauer dieser Epidemie gelangte auf der Krankenhausabteilung des einen von uns unter vielen anderen Typhuskranken auch ein Fall zur Aufnahme, der sämtliche wesentlichen Symptome des Abdominaltyphus bot und dieser Arbeit als Ausgangspunkt diente. Wir geben im Folgenden das Wesentlichste aus der Krankengeschichte dieses Falles wieder:

N. J., 24 Jahre alt, aufgenommen am 1. Dezember 1901. Nichts von pathologischer Bedeutung in der erblichen oder persönlichen Vergangenheit. Keine Syphilis, kein Alkoholismus. Patient erkrankte mit Kopfschmerzen, allgemeiner Müdigkeit und Nasenbluten am 9. November. Seit dem 24. November ist er bettlägerig.

Bei der Aufnahme klagt er über Kopfschmerzen in der Hirngegend, Ohrensausen und starken Schwindel, so daß er nicht imstande ist, den Kopf auch nur wenige Augenblicke aufrecht zu halten.

Das Gesicht ist blaß, mit Ausnahme der Wangen, die etwas gerötet sind. Die Nase ist spitz; die Nasenflügel, die Gesichtsmuskeln und die Zunge zittern. Die Zunge zeigt in der Mitte einen weißlichen Belag, ihre Ränder und die Spitze sind rot, trocken und gesprungen. Die Zähne, das Zahnfleisch und die Lippenschleimhaut sind mit einem braunen trockenen Belag bedeckt.

Die Haut ist heiß und trocken. Die Herzgrenzen sind normal. An der Aorta vernimmt man ein leichtes Geräusch. Temperatur 40°. Puls 95, dikrot.

Der Lungenschall ist normal. Bei der Auskultation vernimmt man allerorts feuchte Rasselgeräusche.

Das Abdomen ist gewölbt. Druck in der rechten Fossa iliaca nicht schmerzhaft. Verstopfung.

Patient, der bei der Aufnahme stumpf ist, verfällt in eine betäubungsähnliche Entkräftung. Er liegt bewußtlos darnieder und bewegt seine Finger in ungleichmäßiger Weise; gegen Abend wird er erregt und verfällt in Delirien. Er bekommt ein Abführmittel, worauf täglich 2—3 weiche, beinahe flüssige, gelbe Darmentleerungen erfolgen.

Dieser Zustand dauert bis zum 5. Dezember; die Temperatur schwankte zwischen 39,8—40,5° abends und 38,5—39,2° morgens; die Pulsschläge betrugen 89—104 pro Minute. Am 5. Dezember werden an der unteren Hälfte der vorderen Thoraxwand und auf dem Abdomen etwa 30 rote, runde oder ovale, kleine, relieflose Flecken sichtbar, die erst auf Druck nach 5 Tagen ganz verschwinden. Gleichzeitig entsteht ein leichter Grad von Trismus und eine ziemliche Steifheit der Nackenmuskeln.

Ohne daß die anderen Zeichen wesentlich geändert werden, werden am 10. Dezember, trotz aller dargereichten Antifebrina und Darmantiseptica, Trismus und Opisthotonus ausgesprochener, unter gleichzeitigem Hinzutreten eines Strabismus convergens.

Am 12. Dezember morgens zeigt Patient eine leichte Lähmung der rechten Körperhälfte, Aphasie, Verlust des Bewußtseins. Unfreiwilliger Kot- und Harnabgang.

12.—14. Dezember ist die Temperatur etwas gesunken: 38—38,5°; Puls aber 100—120 pro Minute.

15. Dezember steigt die Temperatur von neuem auf 39,8°; der Puls beträgt 140—150, ist klein, unregelmäßig, fadenförmig. Die Atmung ist beschleunigt. Tod am 16. Dezember um 3 Uhr morgens.

Wie aus dieser kurzen Krankengeschichte ersichtlich ist, hatten wir es mit einem Kranken zu thun, der sämtliche klassischen klinischen Symptome des Abdominaltyphus bot, mit Ausnahme eines einzigen. Die Verstopfung in den ersten 10—12 Krankheitstagen und das Fehlen der Schmerzen und des Glucksens in der Ileocöcalgegend während der ganzen Krankheitsdauer waren die einzige Abweichung des gewöhnlichen Typhusbildes. Allein das Vorhandensein sämtlicher übrigen Krankheitszeichen konnte keinen Zweifel zulassen. Der letzte Abschnitt des Krankheitsverlaufes, der auch den Tod des Patienten zur Folge hatte, war allerdings ungewöhnlich; allein meningitische und encephalitische Komplikationen gelangen, wenn auch selten, doch auch beim Typhus zur Beobachtung.

Außer den klinischen Zeichen waren noch drei starke Gründe vorhanden, die uns an der Typhusdiagnose festhalten ließen: 1) Die in der Stadt herrschende starke Epidemie; 2) die Thatsache, daß zusammen mit unserem Patienten auch dessen Schwester A. R., die mit ihm wohnte, im Krankenhause Aufnahme fand, und ebenfalls dieselben klinischen Typhussymptome bot, 3) die am 5. Dezember mit dem Blute beider Patienten vorgenommene Serumdiagnose, indem in beiden Fällen das Resultat durchaus positiv war.

Trotzdem waren es aber zwei andere Gründe, die uns veranlaßten, uns näher mit der Diagnose unseres Falles zu befassen, der, wie später bewiesen wurde, thatsächlich nicht an Typhus erkrankt war, trotz des Vorhandenseins der klinischen Symptome und des positiven Ausfalles der Serumreaktion. Diese beiden Gründe waren: 1) Die intra vitam vorgenommene bakteriologische Blutuntersuchung und 2) die Resultate der anatomischen und bakteriologischen Untersuchungen der Leiche des Patienten N. J. In der That züchteten wir aus dem Blute des noch lebenden Patienten N. J. einen kurzen beweglichen Bacillus, der nach Gram nicht färbbar war und durch spätere Identifizierungsstudien als vom Eberth-Gaffky'schen Bacillus verschieden erkannt wurde. Wir werden weiter unten auf die morphologischen und biologischen Eigenschaften dieses Bacillus zurückkommen, und wollen vorerst das Ergebnis der Sektion schildern, die 7 Stunden post mortem vorgenommen wurde.

Kadaver eines mittelgroßen Mannes. Das Knochen- und Muskelsystem gut entwickelt, während das Fettpolster teilweise geschwunden ist. Rötlich-livide, blasse Leichenflecken auf dem Rücken, dem Nacken und den Rückseiten der Extremitäten. Die linke Pupille erweitert. Der Thorax schmal, Hals schlank, das Abdomen eingesunken.

Das Schädeldach dünn; die Diploë stärker injiziert. Im Longitudinalsinus wenig flüssiges Blut. Hirnhäute hyperämisch, ziemlich undurchsichtig, feuchter und in der Umgebung der großen Gefäße gelatinöser. Die Hirnwindungen abgeflacht und die Furchen weniger ausgesprochen. Die Hirnhäute in ihrer ganzen Ausdehnung verwachsen und bleiben bei deren Abtrennung als graue Substanz in feiner Schicht an denselben haften. An dem Eingange der Sylvi'schen Scissur links entsteht durch die Abtrennung der Hirnhäute ein größerer Substanzverlust, indem in dieser Gegend die Hirnsubstanz erweicht ist. Die Erweichung erstreckt sich auf das Operculum der unteren Stirnwindung, auf das ganze Operculum der Insel, auf den vorderen Endteil der oberen und mittleren Schläfenwindungen, auf das vordere Endteil des Gyrus hypocampi und uncinatus, auf alle Windungen der Insel. In der Tiefe umfaßte die Erweichung das Claustrum, die äußere Kapsel, den Vorderteil des Nucleus caudatus, das vordere Drittel der inneren Kapsel und des Nucleus lentiformis. Die Gehirnsubstanz ist hier durch eine weiche, rosig gelbe, konsistenzlose, sehr feuchte Masse dargestellt, die manchmal zu einer halbflüssigen, Brocken, Flocken und zerklüftete Fragmente enthaltenden Substanz umgewandelt ist. Das Ependym der Seitenventrikel ist weicher und stärker injiziert. Die graue Substanz der Windungen ist sehr hyperämisch und weicher.

Die linke Lunge ist blutreicher; die untere Hälfte dunkler, rötlichbraun, dichter, weniger lufthaltig; bei Abschabung ist das Blut dicker und enthält graue, halbflüssige Pfropfen. Die Schnittfläche stellt eine Reihe etwa $1^1/_2$ cm im Durchmesser messende Inseln dar, die etwas erhaben sind; dieselben erscheinen als graue Punkte auf dunklem rotbraunen Hintergrund; auf Druck erheben sich diese Punkte in der Form gleichfarbiger, durchsichtiger, gelatinöser Tropfen. In der ganzen Ausdehnung der Lungen ist die Bronchialschleimhaut injiziert und von einer grauen, durchsichtigen oder graugelben, undurchsichtigen Sekretion bedeckt. Die linke Pleura enthält etwa 150 g klare, leicht rosa gefärbte Flüssigkeit. Die Lungenpleura ist mit einer Schicht retikulierten, elastischen, weichen, feuchten, leicht abziehbaren Fibrins belegt. Auch hier findet sich in den Bronchien schleimige oder schleimig-eiterige Sekretion. Der untere Teil der Lunge ist fester, luftleer, aber zusammengesunken, schlaff, braunrot und fleischähnlich.

Im Pericardium etwa 40 g klarer Flüssigkeit; das viscerale Blatt injizierter und trüber. Die Herzmuskulatur blaß und brüchig. Im linken Ventrikelraume, der

Spitze zu, eine birnförmige Vegetation von der Größe eines Taubeneies, mittels deren Spitze mit der Herzwand verwachsen, schmutzig-rot verfärbt, etwa wie Weinhefe, mit undurchsichtiger Oberfläche, zum Teil retikuliert, zum Teil granulös, auf dem Wege der Brüchigkeit. Sie zeigt ein Hohlcentrum, das von eingedicktem, etwas verfärbtem, mit Fibrinbrocken und Flocken vermengtem Blute eingenommen ist. Der rechte Ventrikel ist etwas erweitert, enthält schwarzes flüssiges Blut und wenige freie, klebrige, schwarze Coagula. Die Orificien des Herzens und der großen Gefäße sind frei; die Klappen glatt und dünn, durchsichtig und elastisch.

Die Leber etwas vergrößert; die Schnittoberfläche braun-rötlich-grau, glatt, feuchter.

Die Milz groß: 9 : 15 cm im Durchmesser; Kapsel dick, aber gedehnt; Pulpa dunkel-rotbraun und leicht abzuschaben. An der Oberfläche ragt ein nußgroßer Knoten hervor, dessen Centrum eingesunken und entfärbt ist, umgeben von einem 1/2 cm breiten, etwas erhabenen, harten, lividen Kreis. Auf der Schnittoberfläche zeigt dieser Knoten an der Peripherie eine Breite von 3 cm, die nach der Tiefe zu schmäler wird; er besteht aus einem gelben, einförmigen Gewebe, das von einem 4—5 mm breiten, saftigen, rötlich-schwarzen, hämorrhagischen Hof umgeben ist.

Die Nierenkapsel ist leicht abziehbar; die Nierenoberfläche glatt, rötlich-grau, mit injizierten Flecken. Die Rindensubstanz ist blasser als die Pyramiden, graugelb, an der Oberfläche etwas hervorragend, feucht, etwas brüchiger, mit Strahlen und Punkten, die den injizierten Glomeruli entsprechen. Auf Druck entleert sich aus den Papillen eine graue, trübe Flüssigkeit. In der linken Niere findet sich ein Knoten, dessen Aussehen demjenigen aus der Milz entspricht; derselbe ist kegelförmig, mit nach der Peripherie gekehrter Basis, 2 cm im Durchschnitt, die gesamte entsprechende Rindensubstanz umfassend und mit der Spitze die Basis der nachbarlichen Pyramide berührend.

Der Magen ist kontrahiert, leer; Schleimhaut etwas hyperämisch.

Der Darm enthält halbflüssige, gelbe Fäkalmassen. Die Darmschleimhaut mit injizierten Gefäßverzweigungen auf einförmigem rosigen Untergrund und von einer Schicht grauer, wenig adhärenter Mukositäten bedeckt. In der Nähe der Ileocöcalklappe, sowohl im Ileon wie im Colon, ist die Schleimhaut stärker injiziert, einförmig rotbraun, mit einigen die Oberfläche hirsekorngroß überragenden Follikeln. An dem Endteile des Ileon, in einer Ausdehnung von etwa 10 cm, zeigen die Kämme der Schleimhautquerfalten graue, schmutzige, 1 mm breite Streifen, die auf eine gleichfarbige, kleienartige Ablagerung zurückzuführen sind; dieselben lassen sich leicht genug abschaben und die Schleimhaut darunter bleibt etwas weniger glänzend und injizierter. Keine Spur von Intumescenz oder Ulceration der Peyerschen Plaques und der Solitärfollikel; nicht die geringste Proeminenz oder Injektion dieses Lymphapparates.

Die Mesenterialdrüsen sind klein; die größte derselben erreicht das Volumen einer kleinen Bohne; sie sind abgeplattet, auf der Schnittfläche weißlich-schiefergrau, durchaus blaß.

Pathologisch-anatomische Diagnose. Gelbe embolische Erweichung in den angegebenen Regionen der linken Hirnhemisphäre, mit akuter diffuser Meningoencephalitis. Schleimig-eiterige, generalisierte Bronchitis mit bronchopneumonischen Herden links und Karnifikation des rechten unteren Lungenlappens. Rechtsseitige serofibrinöse, etwas hämorrhagische Pleuritis. Entartung des Herzmuskels mit Laënnec'scher Vegetation an der Spitze des linken Ventrikels. Generalisierte Enteritis mit leichtem Diphtheritischwerden der Schleimhaut im Endteile des Ileon. Parenchymatöse Entartung der Leber und der Nieren. Chronische und akute Schwellung der Milz. Anämische Infarkte der Milz und der Nieren.

Das Bild, das uns die anatomische Schilderung entworfen hat, entspricht ohne Zweifel dem einer akuten, starken, generalisierten Infektion. Berücksichtigen wir die parietale Endocarditis und die Bildung fibrinöser Vegetation an der Herzwand, die Infarcierung der Milz, der Nieren und des Gehirnes, so haben wir das anatomische Bild der durch einen stark virulenten Streptococcus, Pneumococcus, Gonococcus etc. verursachten Septikämieen vor uns. Am allerwenigsten gemahnt uns diese Sektion an eine Typhusleiche. Die verrukose Endocarditis ist thatsächlich selten beim Abdominaltyphus, aber unmöglich wäre sie schließlich nicht. Was aber auffiel und die Annahme eines Abdominaltyphus ausschloß, war der Zustand des intraabdominalen Lymphapparates.

Allerdings giebt es Autoren, die die Ansicht vertreten, daß es möglich sei, daß ein Mensch an Abdominaltyphus erkranke, ohne die klassischen anatomischen Läsionen zu bieten. Diese Autoren stützen sich auf einige veröffentlichte Fälle von typhischer Septikämie, wobei der intestinale und mesenteriale Lymphapparat unbeschädigt gefunden wurde. Dergleichen Beobachtungen sind thatsächlich vorhanden. Allein, unserer Ansicht nach, sind sie mit einem Mangel behaftet, der ihnen jeden Wert nimmt. Dieser Mangel besteht darin, daß sie älteren Datums sind, indem sie aus einer Zeit stammen, in welcher man nur über primitive zweifelhafte Mittel verfügte, um den Typhusbacillus zu erkennen. Allerdings haben in neuerer Zeit Chiari und Kraus[1]) 5 derartige Fälle veröffentlicht. Allein, soviel wir auch der Kompetenz dieser Verff. vertrauen möchten, wäre es doch nötig, daß diese hochwichtige Thatsache auch von Anderen bestätigt würde. Soviel uns bekannt, ist dies noch nicht einwandsfrei geschehen. Als Bestätigung können die von Weichardt[2]) veröffentlichten Fälle nicht dienen, denn, obwohl der Verf. behauptet, daß keine anatomischen Läsionen vorhanden, ist im Sektionsprotokoll doch folgende Stelle enthalten: „Oberhalb der Klappe ist eine Peyer'sche Plaque geschwollen, etwa 1 mm dick, an der Oberfläche etwas gerötet. In der Umgebung sind vereinzelte Solitärfollikel mäßig geschwollen. Die Mesenterialdrüsen sind etwas geschwollen, ziemlich weich, auf der Schnittfläche rötlich-weiß gefärbt, verquollen." Berücksichtigt man, daß der Patient Weichardt's in der 2. Krankheitswoche gestorben ist, so ist wohl nicht mehr nötig, nach einem Kommentar zu forschen, um den Beweis zu liefern, was für eine typhische Septikämie ohne Läsionen es wohl sein mag.

Schottmüller[3]) gelangt in einer noch weiter unten zu erwähnenden Arbeit zu dem Schlusse, „daß nicht die Veränderungen im Darme bei Typhus die Krankheit an sich bedeuten, sondern die im Blute kreisenden Bacillen, und daß jenen nur der Wert eines Symptomes des Krankheitsprozesses zukommt, welches gelegentlich einmal fehlen kann". Sicherlich verhält es sich teilweise thatsächlich so. Der Eberth-Gaffky-sche Bacillus ist der Hauptfaktor, das unumgängliche primum movens des typhösen Prozesses. Darüber stimmen wir mit Schottmüller überein. Allein wir können nicht dessen Ansicht teilen, daß die anatomischen Läsionen nur ein Symptom wie jedes andere wären, das auch fehlen könnte. Allerdings sind sie ein Symptom, ein Resultat der Krankheit, aber als Symptom, als Resultat, ist, unserer Meinung nach, dessen Anwesenheit ebenso beständig wie das des Bacillus als ätiologischen Faktors. So ist es auch Curschmann[4]) nicht gelungen, unter 577 von ihm secierten Typhusleichen auch nur einen einzigen in dieser Form zu beobachten, und es ist ihm auch in der Litteratur kein derartiger prägnanter und authentischer Fall begegnet — wenn er es auch per analogiam gelten läßt, daß, wie bei Diphtherie, so auch beim Typhus eine Septikämie ohne Läsionen vorkommen könnte.

Ist es uns gestattet, auch unsere eigene Erfahrung zu verwerten,

---

1) Chiari und Kraus, Zur Kenntnis des atypischen Typhus etc. (Zeitschr. f. Heilkunde. Bd. XVIII.)

2) Weichardt, Beitrag zur Lehre der Allgemeininfektion etc. (Zeitschr. f. Hyg. Bd. XXXVI.)

3) Schottmüller, Ueber eine das Bild des Typhus bietende Erkrankung etc. (Deutsche med. Wochenschr. 1900. No. 32.)

4) Curschmann, l. c.

so wollen wir bemerken, daß einer von uns über Notizen von mehr als 200 Typhussektionen verfügt; wir hatten so Gelegenheit, die große Mannigfaltigkeit in Form, Intensität und Lokalisation der typhösen Veränderungen zu beobachten. Was die spezielle Ausdehnung betrifft, so sahen wir Fälle, in welchen die Darmläsionen sich auf einige geschwürige Plaques oder Follikel beschränken, ja selbst auf eine einzige Plaque oder auf ein einziges Geschwür in der Nähe der Bauhini'schen Klappe. Allein wir sahen keinen Fall, wo eine Darmläsion überhaupt nicht vorhanden gewesen wäre, daß aber trotzdem im Blute und in Parenchymorganen der Typhusbacillus nachgewiesen werden konnte.

Ja noch mehr. Gerade in jenen Fällen, in welchen die Darmläsion sehr beschränkt und diskret war, war umgekehrt die Schwellung der Mesenterialdrüsen sehr ausgesprochen, eine Veränderung, die, mehr oder weniger prägnant, in unseren sämtlichen Fällen vorhanden war. Es möchte scheinen, daß gerade dann, wenn der Bacillus, aus uns unbekannten Ursachen den Darm schont, er sich dadurch entschädigt, daß er das intraabdominale Lymphsystem energischer angreift, insbesondere die Mesenterialdrüsen.

Im übrigen gründet sich die oben wiedergegebene Ansicht Schottmüller's nicht auf einen einzigen positiven Fall, den er zu beobachten Gelegenheit hatte. Es ist eine, wie uns scheint, ad hoc fabrizierte Hypothese, um den Wert seiner, allerdings recht interessanten, Beobachtung zu erhöhen, wonach Kranke, die sämtliche klinischen Symptome des Typhus darboten, in ihrem Blute einen von dem Typhusbacillus durchaus verschiedenen Mikroorganismus enthielten. Wir sind der Meinung, daß Schottmüller sich hinter diese Theorie verschanzt habe, nur um dem Einwurf zu begegnen, daß es in seinen Fällen an der wertvollen Bestätigung durch die Sektion fehle. Thatsächlich ist eine derartige Einwendung durchaus berechtigt. Denn, wenn es sich darum handelt, eine neue Thatsache, wie die von Schottmüller angegebene, festzustellen, so ist die Sektionskontrolle äußerst wertvoll. Allein in seinen Fällen ist dieselbe durch die so überzeugende bakteriologische Blutuntersuchung teilweise ersetzt. Andererseits kann der von uns geschilderte Fall, der, wenn wir von der zuletzt aufgetretenen Meningitis absehen, wie ein gewöhnlicher Typhus verlief, in dessen Blut wir intra vitam ebenfalls einen anderen als den Typhusbacillus nachweisen konnten, auch noch dadurch, daß die anatomische Untersuchung negativ ausfiel, als unbestreitbarer Beweis dienen, daß thatsächlich die von jenem Autor geschilderten typhusähnlichen Infektionen vorhanden sind, die aber von anderen Mikroorganismen hervorgerufen werden.

Obwohl das Ergebnis der Sektion für uns die Möglichkeit eines Typhus beseitigt, so war doch die bakteriologische Untersuchung nicht zu umgehen. Thatsächlich war das Ergebnis der intra vitam vorgeführten bakteriologischen Prüfung ebenso wie die Sektion mit dem klinischen Verlaufe nicht übereinstimmend. Nun könnte man aber vielleicht den Vorwurf machen, daß die Untersuchung nicht fehlerfrei war. Deshalb unterwarfen wir den Leichnam einer genauen bakteriologischen Untersuchung.

(Fortsetzung folgt.)

Ueber eigenartige Parasitenfunde bei Syphilis.

Ihre Bedeutung für die Entstehung, Diagnose und Ausbreitung dieser Infektionskrankheit bei Erwachsenen und Kindern, sowie für die Beziehungen der Syphilis zu anderen Krankheitsprozessen.

Von Prof. Dr. **Max Schüller,** Berlin.

Mit 6 Tafeln.

(Fortsetzung.)

Mit Karmin und Hämatoxylin fand ich gleichfalls mitunter die jungen Organismen sehr gut und ziemlich gleichmäßig gefärbt, so daß solche Präparate zuweilen ein vollkommen übersichtliches Bild über die Verteilung und die Häufigkeit der jungen Parasiten geben. Dagegen gelang mir das beim Krebs und Sarkom, wie ich schon früher angegeben habe, nur ganz ausnahmsweise und meist unvollständig. Auch die verschiedenen Kombinationen anderer Farben mit Hämatoxylin, sowie Hämatoxylin nach vorheriger Behandlung mit Flemming's Säuregemisch u. a. gaben zuweilen gute Färbungen. In manchen Fällen ließ aber das Karmin und Hämatoxylin im Stich. Auch Karbolfuchsin, Saffranin[1]) und verschiedene andere Anilinfarben färben die Parasiten, junge Organismen wie „Körner“ (Sporen). Besonders gut treten sie auch mit Indigokarmin durch dunklere Färbung hervor und sind, zumal wenn die Schnitte feucht frisch untersucht werden, dabei auch in der Form gut erhalten. Neuerdings[2]) gelang mir eine schöne Doppelfärbung mit Bismarckbraun und Indigokarmin (Anilinöl, Xylol, Balsameinbettung), wobei die Gewebe bräunlich, die Parasiten, und zwar in allen Entwickelungsstadien, blau erscheinen. Statt des Bismarckbraun kann zur Färbung des Gewebes Boraxkarmin (Salzsäurespiritus, Wässern, Indigokarmin, später Balsameinbettung) genommen werden, wobei die Gewebe rot, die Parasiten blau erscheinen. Besonders die erstere Doppelfärbung kann sehr klare und sehr vollständige Bilder geben. Doch habe ich noch nicht prüfen können, ob sie auch für alle anderen Stadien der Syphilis verwendbar ist. Man muß bei den Untersuchungen über diese wie über die Parasiten bei Krebs sich nie bloß auf Färbungen verlassen, und bei den Färbungen sich niemals auf eine beschränken. Das hindert einseitige Auffassungen und Selbsttäuschungen. Alle Färbungen verändern mehr oder weniger die Form und das Aussehen der Parasiten. An den gefärbten Präparaten ist speziell die genaue Struktur der jungen Organismen im allgemeinen bei weitem nicht so deutlich, wie stets an frisch zubereiteten ungefärbten Präparaten. Dagegen bemerkt man sehr häufig dann einen, zuweilen auch mehrere Kerne in dem Protoplasma der Körperchen. Läßt sich aus der abweichenden Reaktion der jungen Organismen bei der syphilitischen Induration auf die angewandte Farbe

---

1) Die Versuche, welche ich mit der von Leyden und Feinberg verwendeten Färbung von Krebspräparaten machte, ließen dieselbe hier als unbrauchbar erscheinen, wie sie auch nach meiner Prüfung bei Carcinom keinen zuverlässigen Aufschluß über die Parasiten ergab. Vorherige Paraffineinbettung hat überdies, wie ich früher feststellte, einen formverändernden Einfluß auf die jungen Organismen. Dieses Färbeverfahren kann nach meiner Ueberzeugung keineswegs die Hoffnungen erfüllen, welche daran geknüpft wurden.

2) Bei der Korrektur eingefügt.

schon ein Unterschied gegenüber den bei Carcinom und Sarkom vermuten, so tritt ein solcher Unterschied häufig auch in der Farbeneinwirkung auf das Gewebe hervor, zumal bei der Thioninfärbung. Zu bemerken ist, daß bei verschiedenen Färbungen, besonders mit den Anilinfarben, die stets mehr oder weniger zahlreich vorhandenen Bakterien in den Geweben mitgefärbt werden.

Noch will ich betonen, daß die Parasiten in syphilitischen Initialsklerosen die Hämosiderinreaktion geben, ebenso, wie gleich im voraus bemerkt, auch in den primär infizierten Drüsen, sowie, soweit darauf untersucht werden konnte, bei hereditären Affektionen. Am meisten blaugrün gefärbt erscheinen die großen Kapseln, weit weniger die jungen Organismen. Ebenso geben sie mit Rhodankalium mit nachfolgender momentaner Behandlung mit verdünnter Salzsäure die bekannte rötliche Eisenreaktion. Beide Reaktionen sind aber nach meinen bisherigen Feststellungen wesentlich schwächer wie beim Carcinom.

Besonders interessant war es mir, festzustellen, wie sich die geschilderten Parasiten verhielten in einer kleinen Initialsklerose, welche nach vorheriger Hitzeeinwirkung (durch heiße Luft) am lebenden Patienten exstirpiert worden war. In diesem gehärtet höchstens $^1/_2$ cm dicken Präparate blieben die Parasiten nur in den obersten Schichten ungefärbt (z. B. durch Thionin), wohl aber erscheinen sie in den tieferen gefärbt. Bei aufgehellten Präparaten haben die Zellen in den obersten Schichten weniger deutliche Konturen, erscheinen wie verschwommen, die Kerne sind aber meist noch zu erkennen. Die Gänge sind ganz undeutlich, nur erkennbar an dunklerer Färbung; aber der Inhalt erscheint wie ein dunkles Gerinnsel, ohne daß eine scharfe morphologische Definition möglich wäre. Doch sieht man zumal bei Behandlung des Schnittes mit Ammonium muriaticum darin vereinzelte junge Organismen ungleicher Größe. Diese und die im Gewebe erkennbaren jungen Organismen (s. Taf. II Fig. 20 c) sind sehr blaß, die Wandung oft deutlich gequollen, die Körnelung und radiäre Streifung verstrichen, Veränderungen, welche ich auf Grund meiner Versuche an den jungen Organismen der Carcinomkulturen auf die einwirkende höhere Temperatur zurückführe. Die großen Kapseln erscheinen meist unverändert; nur hier und da sieht man mitten zwischen den Geweben eine kleine Blase mit stark gequollener Hülle. In den tieferen Schichten ist das Aussehen und die Form der jungen Organismen an gefärbten wie an ungefärbten Schnitten normal. Hiernach ist eine Tötung der Parasiten in den oberen Schichten zweifellos; dagegen möchte ich eine größere Tiefenwirkung der äußeren Hitzeapplikation in diesem Falle ausschließen. Die Hämosiderin- und Rhodankaliumreaktion zeigt sich anscheinend unverändert.

Die Gänge, welche von der Oberfläche nach der Tiefe zu führen und die mit diesen eigentümlichen parasitären Körpern gefüllt sind, erscheinen so, wie ich es hier beschrieben, in der Mitte der Sklerose beobachtet, ganz von selber als die Invasionswege der längst gesuchten Syphiliserreger. Man kann schon nach der bloßen Betrachtung solcher Präparate, von welchen ich eine Reihe Abbildungen beigebe, sich in der That nicht der Vorstellung entziehen, daß hier die Eingangspforten jener deutlich dargestellt sind. Die Gänge sind, wo ich sie bis jetzt deutlich nachweisen konnte, stets mehrfach vorhanden, aber wesentlich auf die Mitte beschränkt. Gleichwohl sieht man auch in den peripher von der Mitte gelegenen Partieen der primären Induration, wie angegeben, nicht nur im Bindegewebe, sondern in der benachbarten

Epidermis hier und da einzelne junge Parasiten zwischen den Epithelzellen, welche dahin teils von den central gelegenen Gängen gelangen, teils direkt von einzelnen in den oberflächlichen Schichten liegenden Individuen abzustammen scheinen (s. o.).

Es verhält sich augenscheinlich so, daß bei der ersten Infektion einer, wenn auch vielleicht nur durch die Zusammenhangstrennung einiger Zellen betroffenen Stelle oder an einer gröber verletzten Stelle der Hautoberfläche Parasiten abgesetzt werden. Dieselben dringen möglichlicherweise direkt ein oder sie bleiben vielleicht zunächst zwischen diesen Zellen stecken, gelangen hier zur weiteren Entwickelung, und erst die von ihnen ausgehenden jungen Organismen dringen durch das Epithelzellengefüge in das darunter liegende Bindegewebe. Ging die erste Verletzung gleich tiefer, so ist das weitere Eindringen natürlich um so mehr erleichtert. Es läßt sich nach meinen Untersuchungen an Kulturen voraussetzen, daß die Parasiten da, wo sie stecken bleiben, teils durch Teilung, teils infolge der Entwickelung von Körnchen- oder Sporenkapseln, von Brutkapseln und von jungen Organismen zur Bildung der beschriebenen, mit Parasiten gefüllten Gänge im Gewebe führen. Von da aus dringen sie entweder allmählich weiter vor; oder es wandern von hier aus junge Parasiten direkt in das benachbarte Gewebe und durch die Lymphgefäße in die nächsten Lymphdrüsen. Es läßt sich auf diese Weise leicht die ausgedehnte Durchsetzung des Bindegewebes mit Parasiten, sowie die Bildung kleiner Herde von großen Kapseln mitten im Gewebe verstehen, welche ihrerseits wieder Centren für neue Kolonieen von jungen Organismen werden.

Von den durchsetzten Geweben reagiert besonders stark das Bindegewebe. Es wird nicht nur eine sehr starke kleinzellige Infiltration gesetzt, sondern auch eine starke Wucherung der endothelartigen Bindegewebszellen, zugleich mit einer starr werdenden Ausscheidung fädig erscheinenden Fibrins, gleichfalls als Ausdruck des spezifischen giftigen Reizes. Diese eigentümliche entzündliche Infiltration und Wucherung des Bindegewebes findet sich überall am stärksten da, wo die geschilderten Anhäufungen der Parasiten zu bemerken sind. Sie tritt augenscheinlich sehr früh auf und bewirkt die lokale Emporhebung der Epidermisdecke, die Abplattung der Epitheleinsenkungen, die zunehmende Abflachung der Epidermisschicht über der Mitte der Initialsklerose. In anderen Fällen fand ich aber, ähnlich wie oben bei dem Oberlippenschanker beschrieben, die Epidermisdecke ziemlich stark von Rundzellen und einer fibrinösen gerinnselartigen Masse durchsetzt. Sie bildet dann nur noch einen Schorf, in dem nur hier und da noch eine kleine Gruppe platter Epithelien und einige gequollene Epithelzellen an mit Hämatoxylin gefärbten Schnitten zu erkennen sind. Oder die Decke ist vollkommen unterbrochen, das entzündete Bindegewebe ist nur noch von einer feinen Schicht ausgeschiedenen Fibrins oder von einem mit Blut und Gewebebröckeln vermischten dünnen Schorfe bedeckt, in dem zuweilen noch eine einzelne Epithelzelle zu bemerken ist. In dem Maße, als der lokale Entzündungsprozeß zur Granulation resp. Ulceration übergeht, wird es schwieriger oder unmöglich, die hier geschilderte typische Bildung der Invasionsgänge darzustellen.

Aeltere ulcerierte primäre Induration.

Eine an ein vorausgehendes Geschwür an der Infektionsstelle sich anschließende Induration, welche manche Autoren, wie z. B. Kaposi,

als Regel ansehen, habe ich wohl zufälligerweise nicht zur Untersuchung bekommen. Wohl aber konnte ich die Verhältnisse eines Vorhautschankers nach 4-monatlichem Bestande histologisch studieren. Er war schon einige Zeit lokal mit Kalomel behandelt worden und zeigte, als er von mir in meiner Poliklinik exstirpiert wurde, alle Erscheinungen eines typischen harten Schankergeschwüres von der Ausdehnung etwa eines Fünfzigpfennigstückes. Hier findet sich nach der Geschwürstelle hin die Epidermis mehr und mehr von Wanderzellen, aber auch von zahlreichen geschrumpften eckigen Zellen durchsetzt. Das Epithelzellengefüge ist mehr und mehr aufgelockert, die Zellen sind trübe, einzelne zerfallen. Zwischen den Epithelzellen sind aber nicht selten verschieden große und kleine junge Organismen, bald vereinzelt, bald zu kurzen Reihen, bald zu kleinen Gruppen angeordnet, zu bemerken (s. Taf. III, Fig. 24). Am Geschwüre selber findet sich ein von den gleichen eckigen Körperchen, geschrumpften Zellen durchsetztes Granulationsgewebe, während in der Tiefe auffallend breite Züge derben, kernarmen Bindegewebes einzelne Herde einer derben kleinzelligen Infiltration mit breiten Endothelzellen einsäumen. Sowohl in diesen Herden, wie unter der infiltrierten Epidermis sind umschriebene Anhäufungen von kleinen und kleinsten, meist kugelrunden, deutlich doppelt konturierten glänzenden Körperchen zu sehen, an den größeren mit deutlicher radiärer Streifung, welche das Aussehen junger, eben aus einer großen Kapsel entleerter Organismen haben. Sie können in Fuchsin, Karminalaun und in Hämatoxylin sehr gut gefärbt werden, sind aber auch hier noch nach ihrem Bau, sowie bei Hämatoxylin oft auch durch die verschieden nüancierte Färbung der Kapsel und des Protoplasmas ganz deutlich und klar als die jungen Organismen zu erkennen und von den zelligen Elementen und Kernen des Gewebes zu unterscheiden. Ich habe auf Taf. IV, Fig. 31 u. 32 2 Abbildungen nach Hämatoxylinpräparaten ursprünglich in der entsprechenden Färbung bei starker Vergrößerung (Messter 4, Immers. $^1/_{12}$ 1200) gegeben. Man sieht übrigens zuweilen innerhalb oder in nächster Nähe dieser jungen Parasiten auch leere große Kapseln. In Fig. 31 konnte ich eine geplatzte Kapsel, noch gefüllt mit jungen Organismen, abbilden. Der längeren Dauer der Infektion entspricht also hier die weiter fortgeführte Entwickelung der Parasiten. An der Oberfläche dieser Präparate sind mehrfach noch Kalomelpartikel nachzuweisen; in die Tiefe sind sie nicht vorgedrungen und direkt darunter sieht man die eben beschriebenen Bildungen.

Das früher beschriebene Gangwerk der Oberflächenpartieen ist hier nicht mehr zu erkennen. Dagegen sieht man in der noch erhaltenen Epidermis neben dem Schankergeschwüre (ähnlich wie in Fig. 11) von der Außenfläche nach der Tiefe zu verfolgende Reihen von teils runden, teils ovalen, teils birnförmigen jungen Organismen zwischen den Epithelzellen. Sie liegen oft in einer feinkörnigen Masse, welche zum Teil aus zerfallenen Epithelien, zum Teil aus ausgeschiedenem Fibrin zu bestehen scheint. An gefärbten Präparaten treten hier die Kerne der jungen Parasiten sehr klar hervor (s. Fig. 24). An manchen Stellen finden sich in der zerklüfteten Oberfläche große Kapseln. Die oberen Schichten des Geschwüres selber sind von diffus oder in kleinen Reihen liegenden jungen Organismen durchsetzt und lassen nur vereinzelte Kapseln sehen. In den tieferen Schichten aber findet man auch die oben beschriebenen Konglomerate von großen Kapseln und jungen Organismen in dem dicht

infiltrierten Bindegewebe eingebettet oder auch in kleinen Herden narbigen Bindegewebes (wie auf Taf. III, Fig. 23) zusammengepackt. Noch will ich hervorheben, daß auf der Exstirpationsfläche dieser Präparate, sowie der sämtlichen von mir untersuchten, teils von mir, teils von anderer Hand exstirpierten Initialsklerosen stets noch einzelne große Kapseln, sowie junge Organismen angetroffen wurden, womit die so häufig beobachtete Erfolglosigkeit dieser kleinen Operation erklärt sein würde, wenn thatsächlich in diesen von mir entdeckten Parasiten die Ursache der Syphilis zu sehen ist, woran ich wenigstens nicht zweifele.

Die Parasiten in primär syphilitisch infizierter Drüse.

Von primär indurierten Drüsen in der unmittelbaren Nähe der Initialsklerose, also der ersten Manifestation der Syphilis in dem dem Infektionsherde zugehörigen Drüsengebiete, hatte ich nur einmal Gelegenheit, mikroskopische Untersuchungen und auch Kulturen zu machen. Es betraf die Unterkinndrüse bei dem oben erwähnten Oberlippenschanker. Sie wurde von mir exstirpiert und sofort die eine Hälfte frisch und noch warm zur Kultur, die andere Hälfte zur mikroskopischen Untersuchung verwandt. Zur mikroskopischen Untersuchung wurde das Stück in öfter gewechseltem Alkohol von zunehmender Stärke gehärtet und in Celloidin eingebettet; die Mikrotomschnitte teils einfach aufgehellt, teils in verschiedener Weise gefärbt. Das Drüsengewebe sieht ziemlich gleichmäßig entzündlich infiltriert aus. Es fallen sofort mehrere freie große Kapseln einzeln oder zu mehreren zusammenhängend auf, daneben auch kleine Partieen des Maschenwerkes. Aber ebenso sieht man innerhalb des Drüsengewebes selber an einzelnen Stellen kleine Herde von großen Kapseln. In einzelnen Präparaten sind welche, durch den Schnitt getroffen, halbiert, so daß man sie in ihrer vollen Ausdehnung klar übersehen kann, während daneben andere leer, mehr oder weniger zusammengefaltet erscheinen. Die meisten sind auch hier ganz hellgelb nach einfach mit Ammonium muriaticum oder sonstwie aufgehellten Präparaten. Eine kleine Gruppe solcher großer Kapseln findet sich in einer kleinen, gleichfalls erkrankten Nebendrüse von kaum der Größe eines halben Stecknadelkopfes, welche eng verbunden ist mit der größeren indurierten Unterkinndrüse. Die großen Kapseln erscheinen in den Herden zum Teil rötlich gelblich, meist aber ganz blaß und mehr von runder Form und jedenfalls erheblich kleiner als die, welche das Sarkom und Carcinomgewebe aufweist. Sie geben sehr deutliche Hämosiderinreaktion. Die Kapseln haben sehr zarte Wandungen. Die früher beschriebene radiäre Streifung ist nur ausnahmsweise zu sehen. Dagegen bemerkt man viel deutlicher auf der Oberfläche je nach der verschiedenen Einstellung einzelne feine Erhöhungen resp. Vertiefungen. Daß es Vertiefungen sind, läßt sich daraus schließen, daß die Protoplasmastücke aus Kapseln, die man hier und da daneben ohne Hülle sieht, regelmäßig besetzt sind mit vereinzelten kleinen Höckerchen. Das tritt auch in einigen gefärbten Präparaten sehr deutlich hervor (s. Taf. III, Fig. 25). Wie sich teils aus aufgehellten und zerfaserten Schnitten, teils auch aus der Betrachtung gefärbter und ungefärbter Schnitte ergiebt, liegen auch noch innerhalb der Drüse dicht eingebettet ähnlich geformte große Kapseln reihenweise hintereinander. Gerade diese sind auch relativ klein und meist rundlich. Die Feststellung ist schwierig, da sie vollkommen von Zellen umhüllt sind und selber sehr stark aufgehellt erscheinen. Doch gelingt es zuweilen, sie durch Färbungen zur Er-

scheinung zu bringen und noch besser bei der Zerfaserung des Präparates frei heraustreten zu lassen; auch Körnchen-(Sporen-)kapseln und solche mit jungen Organismen finden sich im Drüsengewebe (Taf. III, Fig. 25b). Etwas schwieriger noch sind die jungen Organismen in dem Drüsengewebe zu erkennen. An durch Oele oder mit Ammonium muriaticum aufgehellten Präparaten kann man sie bei geeigneter Beleuchtung oft stellenweise als glänzende, hellgelbliche runde, ovale oder birnenförmige Körper zwischen dem Gefüge der Rundzellen hindurchschimmern sehen. Bei entsprechender Vergrößerung mit Immersion sieht man, daß diese Körper meist zwischen den Zellen, aber anscheinend auch in einzelnen Zellen liegen. Man erkennt unschwer die doppelte Kontur der Hülle und an dieser zuweilen auch eine feine radiäre Querstrichelung, regelmäßig aber eine Körnelung der Oberfläche. Dieselbe erscheint wie besetzt mit kurzen Höckern. Die Größe ist außerordentlich wechselnd. Die Mehrzahl ist größer wie die Kerne der Zelle, vielfach aber begegnet man auch kleineren bis zu den allerkleinsten. Zuweilen bemerkt man in den größeren dieser jungen Organismen im Inneren deutlich kleine rundliche oder auch eckige Körper, von denen dahingestellt bleiben muß, ob es „Sporen“ oder Anlagen junger Organismen sind. Bei denen, die innerhalb einer Zelle liegen, ist ihr Wesen nur bei wechselnder Einstellung oder nur an dem Glanze und dem Hervortreten der Struktur durch die Zellenhülle hindurch festzustellen. An manchen läßt sich daneben der Kern der Zelle erkennen, während bei anderen nur Bröckel neben diesen jungen Organismen liegen. Diese Verhältnisse gewinnen durch glücklich gefärbte Präparate wesentlich an Klarheit. Wie aus einzelnen, die ich abbildete (Taf. III, Fig. 25), ersichtlich ist, sind selbst an diesen intracellulär gelegenen jungen Organismen verschiedene Entwickelungsstadien zu verfolgen, Kernteilung der Parasiten, sowie Ausdehnung zur Kapsel mit jungen Organismen. Die jungen Organismen scheinen besonders nach gut gefärbten Präparaten außerordentlich reichlich, aber ganz regellos verteilt zu liegen. Genaueres Studium indessen ergab, daß sie, abgesehen von ihrer eben besprochenen Anwesenheit in den Zellen, vielfach reihenweise hintereinander in schmalen Gängen oder auch in breiteren, durch Körnchen zerfallener Zellen bezeichneten Bahnen das Drüsengewebe durchsetzen. Aber ich fand sie auch in von Zellen umsäumten Räumen, deren einen im Querschnitt ich abbildete (Taf. III, Fig. 26). Während jene Wege die Parasiten sich augenscheinlich unter Zerstörung von Zellen bahnen, ist es von den letzteren nicht ganz klar, ob es sich um präformierte, nur erweiterte Räume der Drüse oder ob es sich um mehr zufällige Zellanhäufungen, um centralgelegene junge Organismen handelt. An den Gefäßen sieht man die Wand regelmäßig stark verdickt, die Zellen erheblich vermehrt. Die Intercellularsubstanz ist an manchen Stellen entschieden etwas verbreitert, gewissermaßen ersetzt durch eine dickere Masse. Das tritt besonders an gefärbten Präparaten hervor. Was die Färbungen betrifft, so habe ich eine große Zahl der verschiedenartigsten Kombinationen geprüft und bemerke nur, daß ich bisweilen gute Präparate erhielt durch die Anwendung des Hämatoxylins in verschiedener Kombination, mit Säurefuchsin, mit Eosin und anderen Farben, ebenso durch Färbungen mit Methylenblau nach Gram u. s. f. Dies näher zu schildern, unterlasse ich, da ich nur das schon früher bei der Beschreibung der Initialsklerose Gesagte wiederholen würde.

(Schluß folgt.)

Weitere Studien über die Sterilisation von Trinkwasser auf chemischem Wege. (Traube'sches Verfahren mit Hilfe von Chlorkalk.)

[Aus dem Institute für Hygiene und experimentelle Therapie zu Marburg. Abteilung für Hygiene.]

Von Dr. **Engels**, Assistenten am hygienischen Institute.

Im Centralbl. f. Bakt. etc. Abt. I. Bd. XXXI. 1902. No. 13[1]) habe ich eine Anzahl von Versuchen veröffentlicht, die sich mit einem neueren Verfahren, Trinkwasser schnell und sicher keimfrei zu machen, der Schumburg'schen Methode, beschäftigten. Da die bisher dem Nachweise einzelner Keime dienende Methode als eine unzureichende bezeichnet werden mußte, so schlug ich einen Weg ein, der es gestattete, Bakterien, wenn überhaupt noch solche im Wasser nach dem Zusatze des Desinficiens am Leben geblieben waren, auf einfache und sichere Weise herauszuzüchten, indem ich diese vielleicht auch schon geschädigten Mikroorganismen sofort wieder unter günstige Lebensbedingungen setzte.

Dieses Verfahren habe ich eingehend in meiner früheren Arbeit beschrieben, und kann ich an dieser Stelle darauf verweisen.

Dieses unser Vorgehen benutzte ich nun auch bei der folgenden Nachprüfung der Traube-Lode'schen Chlorkalksterilisation des Trinkwassers, zu welcher Arbeit mich außer meinen Erfahrungen aus meiner ersten Veröffentlichung über das Schumburg'sche Wasserreinigungsverfahren noch die Schüder'sche Bemerkung in Bd. XXXIX. Heft 3 der Zeitschr. f. Hyg. etc. veranlaßte[2]), daß auch seine Versuche über Wassersterilisation mit Chlorkalk nach seinem Verfahren nicht sämtlich günstig ausgefallen seien. Bevor ich jedoch auf meine eigenen Versuche näher eingehe, möchte ich zunächst mit einigen Worten auf den Entwickelungsgang der Chlorkalksterilisation zurückgreifen.

Der Chlorkalk, auch Bleichkalk genannt, stellt keinen einheitlichen Körper dar, bildet vielmehr entsprechend seiner Darstellung durch Ueberleiten von Chlor über gelöschten Kalk ein Gemenge von Calciumhypochlorit mit Calciumchlorid und Wasser nach der Formel:

$$2\ Ca(OH)_2 + 4\ Cl = Ca(OCl)_2 + CaCl_2 + 2\ H_2O.$$

Da jedoch Calciumchlorid sich aus dem Chlorkalk nicht isolieren läßt, so ist es nach Odling und Lunge wahrscheinlich, daß im Chlorkalk die Verbindung $CaCl_2O$ enthalten ist, der Chlorkalk also aus $2\ Ca \langle {OCl \atop Cl}$ besteht. Der obigen Gleichung nach müßte der vollständig mit Chlor gesättigte Chlorkalk 48,9 Proz. Chlor enthalten. Da es jedoch bei der Darstellung des Chlorkalks nicht gelingt, alles Calciumhydroxyd mit Chlor zu verbinden, ein Teil des Calciumhydroxyds vielmehr stets

1) Engels, Das Schumburg'sche Verfahren der Trinkwasserreinigung mittels Brom. (Centralbl. f. Bakt. etc. Abt. I. Bd. XXXI. 1902. No. 13.)

2) Zeitschr. f. Hyg. etc. Bd. XXXIX. Heft 3.

unverändert im Chlorkalk vorhanden bleibt, so sinkt der Chlorgehalt meistens auf 25 Proz. herunter. Der Chlorkalk ist ein weißes, lockeres Pulver von chlorähnlichem Geruch. Derselbe ist äußerst leicht veränderlich, sowohl an der Luft, wobei durch das Kohlendioxyd der Luft unterchlorige Säure freigemacht wird, als auch in geschlossenen Gefäßen, in denen er sich allmählich unter Entwickelung von Sauerstoff zersetzt, welche Sauerstoffentwickelung unter dem Einflusse von Licht und Wärme sogar explosionsartig erfolgen kann. Der Bleichkalk darf deshalb nur in leicht geschlosseuen Gefäßen an dunklen und kühlen Orten aufbewahrt werden.

Bei der Lösung des Chlorkalkes in Wasser, wobei eine alkalisch reagierende Flüssigkeit entsteht, soll nur das Calciumchlorid und Calciumhypochlorit in Lösung übergehen, während das bei der Darstellung unverändert gebliebene Calciumhydroxyd zum größten Teile ungelöst bleibt. Dieses ungelöste Calciumhydroxyd imponiert dann als feiner, flockiger Niederschlag. Schon lange ist eine solche wässerige Lösung von Chlorkalk als geeignetes Bleichmittel bekannt, weshalb das Pulver auch den Namen „Bleichkalk“ erhalten hat.

Die Anwendung des Chlorkalkes zur Wasserdesinfektion beruht nun aber, wenigstens zur Hauptsache, auf der Entwickelung von freiem Chlor aus dem Chlorkalk. Chlorkalkwirkung ist im wesentlichen nichts anderes als Chlorwirkung. Diese Wirkung erhält man sehr leicht durch die Einwirkung von Salz- oder Schwefelsäure auf das Pulver, wobei das sämtliche wirksame Chlor des Chlorkalks entbunden wird. Gerade diesen Vorgang hat man in den letzten Jahren mit Vorliebe zur Sterilisation von Trinkwässern der verschiedensten Art auszunutzen gewußt, und es resultierte daraus die bekannte Traube'sche Methode der Trinkwasserreinigung. Traube war jedoch nicht der erste, der auf die desinfizierende Wirkung des Chlorkalks aufmerksam gemacht hat. Ihm gebührt aber das Verdienst, die Desinfektionskraft des Bleichkalkes als erster bei der Sterilisation von größeren Quantitäten Trinkwassers mit Erfolg verwertet zu haben.

Es war im Jahre 1881, als Koch in seiner grundlegenden Arbeit „Ueber Desinfektion“ [1]) zum ersten Male eine bakteriologische Prüfung des Chlorkalkes vorgenommen hatte. Koch ließ eine 5-proz. wässerige Chlorkalklösung auf an Seidenfäden getrocknete Milzbrandsporen einwirken. An verschiedenen Tagen wurde eine Probe der Milzbrandsporen der Flüssigkeit entnommen und auf ihre Entwickelungsfähigkeit geprüft. Dabei konnte Koch konstatieren, daß nach einer 1-tägigen Einwirkungsdauer das Wachstum des Milzbrandbacillus allerdings noch kräftig, aber etwas verzögert war, nach einer 2-tägigen nur eine „lückenhafte Entwickelung“ zustande kam, während nach 5-tägiger Einwirkung der 5-proz. Chlorkalklösung die Milzbrandsporen abgetötet waren.

Zu ähnlichen Resultaten gelangten auch Sternberg [2]), Jaeger [3]),

---

1) Mitteil. a. d. kais. Gesundh.-A. Bd. I.

2) Disinfection and disinfectants. (Preliminary report made by the committee of disinfectants of the American public of the health association.) — Disinfection and individual prophylaxis against infectious diseases. (Lombe prize essai.)

3) Untersuchungen über die Wirksamkeit verschiedener chemischer Desinfektionsmittel bei kurz andauernder Einwirkung auf Infektionsstoffe. (Arb. a. d. kais. Ges.-A. Bd. V. Heft 2.)

Nissen[1]), Liborius[2]), Kitasato[3]), E. von Esmarch[4]) und Pfuhl[5]).

Es würde mich zu weit führen, wollte ich die Prüfungsmethoden und die Versuchsanordnungen der einzelnen Autoren der Reihe nach aufzählen. Soviel Beachtenswertes dieselben auch bieten, so muß ich mich doch damit begnügen, ihre Resultate nur kurz zu streifen.

Im Jahre 1894 veröffentlichte nun Traube[6]) in der Zeitschr. f. Hyg. etc. sein „Einfaches Verfahren, Wasser in großen Mengen keimfrei zu machen“. Traube hat sich allerdings nur mit der Einwirkung des Chlorkalkes auf die gewöhnlichen Wasser- und Fäulnisbakterien beschäftigt. Die Vernichtung der pathogenen Bakterien „dürfte“, meint Traube, „nach den Versuchen von R. Koch und F. Nissen für die meisten pathogenen Bakterien nicht zweifelhaft sein“. Traube's Verfahren, Wasser in kurzer Zeit keimfrei zu machen, beruht nun darauf, minimalste Mengen von Chlorkalk, 0,0004260 g mit einem Gehalte von 0,0001065 g wirksamen Chlors zu 100 ccm stark bakterienhaltigen Wassers zuzusetzen. Bereits nach 2 Stunden sollen sämtliche vorhandenen Keime abgetötet sein. Zur Entfernung des den Geschmack unangenehm beeinflussenden Chlorkalkes setzte Traube 0,000209 g Natriumsulfit hinzu. Statt Natriumsulfit kann auch Calciumsulfit zur Verwendung kommen. „Das nacheinander mit Chlorkalk und Natrium- oder auch Calciumsulfit behandelte Wasser schmeckt mit und ohne den geringen Gehalt an Sulfit vollkommen rein“. Ein auf diese Weise behandeltes Wasser soll keinen wesentlichen Zusatz an fremdartigen Stoffen erfahren. Es schien demnach ein chemisches Mittel gefunden zu sein, welches in Bezug auf Trinkwassersterilisation nicht nur rasch und billig arbeitete, sondern auch nach dem Gebrauche rasch, billig und spurlos, ohne fremdartige Bestandteile zurückzulassen, entfernt werden konnte.

Ebenso günstig lauteten die Erfolge der ersten Nachprüfungen Kratschmer's[7]), der auf der 66. Versammlung deutscher Naturforscher und Aerzte in Wien die Aufmerksamkeit der Teilnehmer auf die einfache und wenig kostspielige Trinkwasserreinigung durch Chlorkalk lenkte. Auf derselben Versammlung empfiehlt Karlinsky[8]) eine Kombination des Traube'schen Verfahrens mit einem mechanischen Filterverfahren zur Entfernung von größeren Verunreinigungen, um ein in jeder Beziehung einwandfreies, appetitliches und bekömmliches Wasser zu erhalten.

Dem Traube'schen Verfahren schien eine große Zukunft bevorzustehen, da es besonders geeignet schien, ein unschädliches Wasser für

1) Ueber die desinfizierende Eigenschaft des Chlorkalks. (Zeitschr. f. Hyg. etc. Bd. VIII. 1890.)
2) Untersuchungen über die desinfizierende Wirkung des Kalkes. (Zeitschr. f. Hyg. etc. Bd. II. p. 15.)
3) Ueber das Verhalten der Typhus- und Cholerabacillen zu säure- und alkalihaltigen Nährböden. (Zeitschr. f. Hyg. etc. Bd. III.)
4) Die Milzbrandsporen als Testobjekt bei der Prüfung von Desinficientien. (Zeitschr. f. Hyg. etc. Bd. V.)
5) Desinfektion der Typhus- und Choleraausleerungen mit Kalk. (Zeitschr. f. Hyg. etc. Bd. VI.)
6) Zeitschr. f. Hyg. etc. Bd. XVI. 1894.)
7) 66. Versammlung deutscher Naturforscher und Aerzte in Wien.
8) Kongreßbericht. (Wien. med. Wochenschr. 1894. p. 915.)

den Gebrauch der Truppen, für die Tropenreisenden, zur Zeit von Epidemieen in den verseuchten Distrikten schnell herzustellen. Sickenberger und Kaufmann[1]) haben auf Anregung der hygienischen Abteilung der obengenannten Versammlung deutscher Naturforscher und Aerzte das Traube'sche Verfahren in Kairo geprüft und die Brauchbarkeit auch bei mit Cholerabakterien infiziertem Wasser nachgewiesen.

Schon im folgenden Jahre 1895 erschienen zwei weitere Arbeiten, welche dieses Thema zum Gegenstande ihrer Erörterungen hatten: das waren die Abhandlungen von Bassenge und von Lode.

Bassenge[2]) fand, daß die von Traube angegebene Chlorkalkmenge bei einer Einwirkungszeit von 2 Stunden zu gering sei, um pathogene Keime sicher zu vernichten. Andererseits hält er mit Recht die Einwirkungsdauer von 2 Stunden für viel zu lang. Es gelang Bassenge, innerhalb 10 Minuten mit ca. 0,15 g käuflichen Chlorkalks 1 l Wasser, auch mit Typhus- und Cholerakulturen versetzt, vollständig zu sterilisieren. Zwecks Neutralisierung des zur Desinfektion nicht verbrauchten Chlors empfiehlt er statt des Natriumsulfits, das, zu Natriumsulfat oxydiert, wegen seiner abführenden Wirkung Störungen im menschlichen Körper herbeiführen könne, das Calciumbisulfit, durch welches allerdings eine geringe Menge schwefelsauren Kalkes als Niederschlag ausgefällt wird. „Das so behandelte Wasser ist unschädlich, bekommt keinerlei Beigeschmack und gewinnt an Härte. Es kann längere Zeit hindurch genossen werden, ohne irgend welchen Einfluß auf den Organismus auszuüben, da es durch die angegebene chemische Behandlung keine anderen Bestandteile bekommt, als in den meisten natürlichen, zum Trinken gebrauchten Wässern vorhanden sind."

Mit diesen im wesentlichen übereinstimmende Schlußfolgerungen enthält die von Lode[3]) erschienene Veröffentlichung desselben Jahres. Da, wie ich schon oben erwähnt habe, Traube eine Prüfung des Verhaltens pathogener Mikroorganismen gegen die angegebenen Chlormengen nicht angestellt hatte, sondern sich lediglich mit der Abtötung von in natürlichen Wässern vorkommenden Saprophyten begnügt hatte, so unternahm es jetzt Lode, umfangreiche Versuche mit Bacterium coli commune, Typhusbacillen, Vibrio cholerae asiaticae, Milzbrandsporen und mit natürlichem und künstlich verunreinigtem Wasser vorzunehmen. Lode stellte fest, daß die von Traube angenommene Menge von Chlor pro Liter selbst in günstigen Fällen in einer für die Praxis in Betracht kommenden Zeit nicht genügend sei. Sogar eine Einwirkungsdauer bis zu 24 Stunden konnte nach Lode's Versuchen nicht sämtliche Keime mit Sicherheit vernichten.

„Es steht daher fest, daß die angegebene Menge viel zu klein ist und etwa um das 30-fache erhöht werden muß. Dafür kann man aber mit der 30-fachen Dosis die Zeitdauer der Einwirkung erheblich abkürzen."

Lode nimmt an, daß bei einer Einwirkungszeit von 10 Minuten und bei Verwendung von 30 mg aktiven Chlors pro Liter sämtliche

---

1) La stérilisation de l'eau par l'hypochlorite de sodium. (Le Progrès. Journal quotidien paraissant au Caire. 1894. 13. déc.)

2) Zur Herstellung keimfreien Trinkwassers durch Chlorkalk. (Zeitschr. f. Hyg. etc. Bd. XX. 1895.)

3) Die Gewinnung von keimfreiem Trinkwasser durch Zusatz von Chlorkalk. (Verfahren von M. Traube.) (Arch. f. Hyg. Bd. XXIV. 1895. p. 336.)

vegetativen Formen der Mikroorganismen abgetötet seien. Wir sehen, daß Lode, obschon er seine Versuche unabhängig von Bassenge angestellt hat, doch zu demselben Resultate gekommen ist. Bezüglich der Vernichtung von Dauersporen versagt nach Lode's Ansicht nicht nur Chlorkalk, sondern jedes bisher angewandte chemische Reinigungsverfahren. Ein Umstand, welcher dem ganzen Verfahren nachteilig anhaftet, ist die schwere Benetzbarkeit des Chlorkalkes. Will man diesem Uebelstande mit Erfolg begegnen, so muß man entweder das Chlorkalkpulver mechanisch fein mit Wasser verreiben oder jedoch das Chlor durch eine Säure freimachen. Der erste Weg ist der einfachere und billigere, erfüllt seinen Zweck aber nur unvollkommen. Lode fügte deshalb, den anderen Weg einschlagend, dem in wenig Wasser verteilten Chlorkalke eine geringe Menge reiner Citronensäure in Substanz zu, und dieses Gemisch wurde in das zu sterilisierende Wasser übertragen. Die durch die Citronensäure freiwerdende Menge aktiven Chlors kommt dem gesamten Gehalte an wirksamem Chlor sehr nahe, wie vergleichende Versuche mit einigen Tropfen Salzsäure ergaben. Es traten zwischen 37 und 39 mg Chlor in Wirksamkeit. Lode benutzte 0,25 g Citronensäure pro Liter Wasser, wodurch der Geschmack eines so behandelten Wassers in keiner Weise alteriert wurde.

Lode giebt daher auf Grund seiner Versuche folgende Sterilisationsanordnung für die Praxis an:

„Es würde z. B. im Felde Wasser in größeren Mengen von 10—20 l in den sogenannten Wassereimern herbeigeschafft. Sodann wird der der Wassermenge entsprechende Chlorkalk entweder im Rührlöffel mit wenig Wasser angerieben und dem Wasser zugesetzt, oder der — ebenfalls im stark gehöhlten Rührlöffel — bereiteten Chlorkalklösung die Citronensäure zugesetzt und der Inhalt des Löffels durch Hin- und Herschwenken im Wasser verteilt. Der Chlorkalk, sowie eventuell die Citronensäure befinden sich in verschieden gefärbten Ceratpapieren in einer am besten mittels eines Gummiringes verschließbaren Glas- oder Blechbüchse. Nach 10 Minuten .... fügt man das 2. resp. 3. Pulver, Natriumsulfit enthaltend, entsprechend dem zugefügten Chlorkalk, dem Wasser zu.“ Da das Wasser sich durch flockige Partikelchen leicht getrübt zeigt, so kann nach Lode dasselbe durch Filtration, z. B. durch Säcke aus Flanell oder durch ein Asbestfilter, ansehnlich und appetitlich gemacht werden. Auf diese Weise kam Lode zu befriedigenden Resultaten. Charakteristisch sind die letzten Worte Lode's. Danach betrachtet der Autor dieses Verfahren nur als einen Notbehelf für schnelle Herbeischaffung geringer Quantitäten sterilen Wassers. „Man wird es nicht leicht für eine Wasserversorgung größerer Städte verwenden können, da es sich bei der vergrößerten Menge von Chlorkalk und Antichlor zu teuer stellt und es überhaupt fraglich ist, ob man bei den großen Wassermengen .... die Operationen des Mischens mit jener Präzision würde durchführen können, wie sie das Verfahren vorschreibt.“

Das ursprünglich Traube'sche Verfahren hat demnach durch die Vermehrung der anzuwendenden Reagentien eine Aenderung erfahren, welche die Methode kompliziert. Nichtsdestoweniger wurden im Laufe der Jahre praktische Versuche in größerem Maße angestellt.

Der erste derartige Versuch wurde auf Vorschlag von Kusy's durch Dr. Meerans[1]) zur Zeit der großen Typhusepidemie in der

1) Die Typhusepidemie in Pola im Herbst 1896 und im Winter 1896—1897. (Oesterr. Sanitätswesen. Beil. zu No. 52 v. 29. Dez. 1898.)

österreichischen Kriegshafenstadt Pola im Herbst und Winter 1896/1897 vorgenommen. Es wurde statt des verdächtigen Trinkwassers der Bevölkerung ein chloriertes Wasser zum Genusse und Gebrauche verabfolgt. Es wurden im ganzen 855 Gärbottiche bezw. 17100 hl Wasser nach Traube-Lode behandelt mit der kleinen Abweichung, daß statt des Natriumsulfits das unterschwefligsaure Natrium zwecks Neutralisierung genommen wurde. Die Bevölkerung hatte anfangs eine große Abneigung, das getrübte Wasser zu genießen. Daher ist es erklärlich, daß der Bedarf anfangs ein geringer war. Erst allmählich gewöhnten sich die Einwohner an das trübe Aussehen, „so daß an manchen Tagen 40 Bottiche oder 8000 l beigestellt werden mußten".

Der Hauptvorwurf, der sich aus diesem ersten Versuche ergab, war das gerade nicht den Appetit anregende, trübe Aussehen des chlorierten Wassers. Auch die bakteriologischen Prüfungen sollen weniger günstige Resultate, wenigstens im Anfange, ergeben haben.

Dieser Umstand veranlaßte dann Lode[1]), nochmals sein Verfahren eingehend zu prüfen; er versuchte zunächst, nach seiner Methode Wasser in großen Mengen zu sterilisieren. Dazu stand ihm ein Holzbottich in einem Garten in Klosterneuburg bei Wien zur Verfügung. Die zu sterilisierdende Wassermenge betrug etwa 4 cbm. Mit Hilfe einer Holzstange wurde der fein zerriebene Chlorkalk im Wasser gründlich, ca. 5 Minuten lang, verteilt, sodann nach dem Zusatz von Antichlor nach 10, 30—120 Minuten Proben aus verschiedenen Tiefen zwecks bakteriologischer Untersuchung entnommen. Lode stellte auf diese Weise 6 Versuche an und hat die Einwirkung des Chlors nur auf die im Wasser vorhandenen resp. demselben künstlich zugesetzten saprophytischen Bakterien aus leicht erklärlichen Gründen nachzuweisen gesucht. Die Versuche fielen relativ günstig aus.

Lode hatte weiterhin Gelegenheit, in einem Schwimmbade einen Desinfektionsversuch im großen anzustellen. Die Gesamtmenge des Badewassers am Tage des Versuchs betrug 151,15 cbm. Da pro Liter 30 mg Chlor zur Einwirkung kommen sollten, mußten dem Wasser insgesamt 14,2 kg Chlorkalk zugesetzt werden, welche Menge in Portionen von $^1/_2$ kg, mit wenig Wasser in einem Holzschaffe verrieben, durch ein Sandsieb gegossen, um die nicht zerkleinerten Bröckelchen zurückzuhalten, in das Bassin gegossen wurde. $^1/_4$ Stunde lang wurde das Wasser des Bassins mit großen Stangen gemischt. Die nach $^1/_2$ und $2^1/_2$ Stunden angelegten Aussaaten ergaben die vollständige Sterilisierung des Wassers. Der Kontrollversuch wies 316 Keime pro Kubikcentimeter auf. Nach diesen positiv ausgefallenen Versuchen ging Lode dazu über, zu prüfen, durch welche Reagentien das überschüssige Chlor am zweckmäßigsten gebunden werden könnte.

Lode gelangt zu der Ueberzeugung, daß das Natriumsulfit das geeignetste, das Wasser in seiner Zusammensetzung am wenigsten beeinträchtigende Neutralisationsmittel ist. Schließlich ließ es sich Lode angelegen sein, die Trübung des mit Chlorkalk versetzten Wassers zu beseitigen.

Die im Wasser als feine Flöckchen ungelöst suspendierten Teile bestehen größtenteils aus Calciumhydroxyd, wie ich eingangs näher erläutert habe. Dadurch wird nicht nur das Wasser unappetitlich, son-

---

1) Weitere Studien über die Sterilisierung des Wassers durch Zusatz von Chlorkalk. (Hyg. Rundschau. Jahrg. IX. 1899.)

dern, wie Lode mit Recht hervorhebt, „geschmacklich verändert". Von seinem ersten Vorschlage, das Wasser mit Hilfe von Flanell- oder Asbestfiltern von seinen Trübungen zu befreien, ist Lode vollständig zurückgekommen. Er strebte die Klärung durch Zusatz von Säure an; dadurch soll einerseits ein „absolut klares" Wasser gewonnen, andererseits der durch Chlorkalk geschaffene, gering laugenhafte Geschmack beseitigt werden. Am geeignetsten zu diesem Zwecke fand Lode Salzsäure und Kohlensäure. Durch den Zusatz von Salzsäure wird gleichzeitig sämtliches vorhandene Chlor befreit und so die sichere Abtötung der Mikroorganismen besser gewährleistet. Es ergab sich, daß in allen Fällen eine Menge von 0,073 g HCl ausreichte. Die zuzusetzende Salzsäuremenge läßt sich nach einer von Lode entworfenen Tabelle stets leicht berechnen.

Aber auch der Salzsäurezusatz ließ nicht alle Trübungen verschwinden; vielmehr blieb am Boden noch ein unlösliches Sediment zurück. Die Versuche, mit Hilfe von Kohlensäure die Flocken zu entfernen, hatten einen ähnlichen Erfolg.

Lode empfiehlt sein modifiziertes Verfahren der Trinkwasserreinigung durch Chlorkalk mit folgenden Worten:

„Man wiegt pro Liter Wasser 0,15 g käuflichen, trockenen, am besten aus der Apotheke oder einer zuverlässigen Droguerie bezogenen Chlorkalkes ab und verreibt diesen mit möglichst wenig Wasser (1 g Chlorkalk mit etwa 1 ccm Wasser) zu einem dünnflüssigen Brei in einer Reibschale, bei größerem Betriebe in einer Holz- oder Thonschale von entsprechenden Dimensionen. Dann trägt man den Brei, stets gut umrührend, in das zu desinfizierende Wasser und setzt zugleich die entsprechende Menge Salzsäure (nach der Tabelle) zu. Nach einer halben Stunde ist die Klärung und die Desinfektion vollzogen, worauf pro Liter 0,3 g Natriumsulfit zugesetzt werden. Das Wasser ist ohne weiteres zum Konsum geeignet."

Genau nach dieser Vorschrift stellte auch Kaess[1]) einige Versuche an mit dem Resultate, daß durch 0,15 g Chlorkalk und 8 Tropfen Salzsäure auf 1 l Wasser nach $^1/_2$-stündiger Einwirkungszeit völlige Sterilität erzielt wurde.

Unter den verschiedenen Methoden, durch Zusatz von Chemikalien ein keimfreis Wasser zu erhalten, hat der Traube-Lode'sche Vorschlag allein bislang allgemeine Anerkennung gefunden und das mit Recht. Blicken wir nur zurück auf die zahlreichen vorzüglichen Resultate, welche sämtliche Autoren, die sich mit der Nachprüfung dieses Desinfektionsmittels beschäftigt haben, erzielten! Alle kommen zu dem übereinstimmenden günstigen Urteile über die Chlorkalksterilisation von Trinkwasser. Lehmann[2]) sagt in seinem Lehrbuche: Die Methoden der praktischen Hygiene. 1901 sogar: „Für die Chlorkalkreinigung ist das Problem gelöst". Nach den bisherigen Erfahrungen war er zu dem Ausspruche berechtigt.

Die mir zur Beantwortung gestellte Frage war nun: Ist der Chlorkalk ein so vorzügliches Wasserdesinfektionsmittel auch dann, wenn wir zur Feststellung der gelungenen Sterilisation des Wassers nicht nur einige Kubikcentimeter des Wassers zu Platten verarbeiten, sondern die

---

1) Ueber die Sterilisation von Wasser durch Jod, Chlor und Brom. (Pharm. Ztg. 1900. No. 49. p. 471.)

2) Die Methoden der praktischen Hygiene. 1901.

ganze Wassermenge in günstigen Nährboden verwandeln? Einzelne Versuche in dieser Richtung liegen jetzt bereits vor, für den Chlorkalk allerdings nur ganz kurze Beiträge. Schon Schüder, der wohl stets die ganze behandelte Wassermenge auf lebende Keime untersucht hat, sagt in kurzer Bemerkung, daß er dabei zu schlechteren Erfolgen mit Chlorkalk gekommen sei.

Nach Schüder's Vorgange ist dann auch Rabs[1]) bei seiner Nachprüfung der Chlorkalkreinigung von Trinkwasser vorgegangen. „Versuche, die ich nach dieser Methode in den angegebenen Mengen mit Chlorkalk und Eau de Lavarraque bei einer Einwirkungszeit von 10 Minuten mit Choleravibrionen anstellte, ergaben fast ausschließlich ungünstige Resultate“. Versuche auch mit größeren Mengen, 5 l, fielen gleich ungünstig aus. Auch bei den Versuchen mit Typhusbacillen „wuchsen in mehr als der Hälfte Typhusbacillen“. Bei einer Einwirkungsdauer des Chlorkalkes von 30 Minuten waren sämtliche Choleravibrionen wie Typhusbacillen abgetötet. Bemerkenswert ist die Thatsache, daß Rabs bei möglicher Innehaltung der Lode'schen Anordnung schon bei Einwirkung von 10 Minuten eine deutlich abtötende Wirkung des Chlorkalkes konstatieren konnte.

Ein anderes Chlormittel haben Hünermann und Deiters[2]) auf die Wirkung als Wasserdesinficiens geprüft. Die Autoren kommen in ihrer Arbeit „Ueber die Desinfektion des Trinkwassers mit Natriumhypochlorit“ zu dem Schlusse, daß das NaOCl viel rascher als der Chlorkalk desinfiziere, da das ganze in NaOCl enthaltene Chlor sich fast augenblicklich in der ganzen Wassermenge verteile und darauf einwirke.

In meinen eigenen Versuchen suchte ich nun die Einwirkung des Chlorkalkes nicht nur auf die gewöhnlichen Wasserbakterien, sondern auch auf die dem Versuchsquantum Wasser künstlich zugesetzten pathogenen Keime, und zwar Choleravibrionen und Typhusbacillen, festzustellen.

Um die Einwirkung des Chlors auf Wasserbakterien kennen zu lernen, wurde Wasser der verschiedensten Herkunft benutzt und zwar:

1) Leitungswasser,

2) Deutschhausbrunnenwasser (in den Tabellen unter „Brunnenwasser“),

3) Lahnwasser,

4) Ketzerbachwasser, welches meist sehr verunreinigt war.

Diese 4 Wasserarten unterscheiden sich nicht nur durch die verschieden große Bakteriezahl, sondern zeigen auch Verschiedenheiten im Gehalte an organischer Substanz. Es ist bekannt, daß ein Teil des zuzusetzenden Chlors sofort von den organischen Substanzen gebunden, seine desinfizierende Wirkung demnach aufgehoben wird. Ein solches Wasser bedarf eines größeren Zusatzes von Desinficientien, soll die keimtötende Wirkung erzielt werden. Ich habe nun verschiedene Male und zu verschiedenen Zeiten die oben bezeichneten Wasserarten chemisch untersucht und kam zu folgendem Resultate. Die organischen Substanzen in 1 l erfordern im Mittel zur Oxydation:

beim Leitungswasser	1,1 mg O
„ Deutschhausbrunnenwasser	4,1 „ „
„ Lahnwasser	5,4 „ „
„ Ketzerbachwasser	6,1 „ „

1) Beiträge zur Trinkwasserdesinfektion mit Chlor. (Hyg. Rundschau. 1901. 15. Nov.)

2) Dtsch. med. Wochenschr. 1901. No. 24. p. 391.

Um die Keimzahl der einzelnen Wasserarten kurz vor dem Versuche festzustellen, wurden meist 0,5 ccm zu einer Gelatineplatte gegossen, bei dem sehr schmutzigen Ketzerbachwasser nur 0,05 ccm. Die Zählung wurde mit dem Wolfhügel'schen Apparate nach 2 Tagen vorgenommen.

Die als Testobjekte verwandten pathogenen Keime, die Choleravibrionen und die Typhusbacillen, stammten stets von 24-stündigen Agarkulturen. Die Bouillonaufschwemmungen solcher Kulturen wurden 1 l vorher im strömenden Dampfe sterilisierten Leitungswasser zugesetzt, zu je 1 l 1 ganze Agarkultur. — Sterilisiertes Wasser wurde deshalb genommen, um die am Leben gebliebenen Keime nach der Chlorierung bequemer herauszüchten zu können.

Nun kam die Sterilisierung eines solchen Kolbens:

Die zugesetzte Chlorkalkmenge betrug in jedem Falle (nach Lode's Vorschrift) 0,15 g. Um das Chlor direkt zur Einwirkung gelangen zu lassen, wurden nach dem Chlorkalkzusatze dem Wasser (nach Lode's Tabelle) 6 Tropfen einer 25-proz. Salzsäure und nach einer verschieden langen Einwirkungsdauer des Desinficiens 0,3 g (ebenfalls Lode's Anordnung) Neutralisationssalz, Natriumsulfit, zugefügt.

Das Neutralisationssalz habe ich stets solange einwirken lassen, wie in dem jedesmaligen Versuche das Chlor. Der Gehalt der jedesmal zugesetzten Chlorkalkmenge an wirksamem Chlor wurde regelmäßig bestimmt.

Zu 15 ccm einer frisch bereiteten 10-proz. farblosen Jodkaliumlösung wurde eine genau abgemessene Menge der Chlorkalklösung (meist 0,1—1,0—2,0 ccm) zugesetzt. Es trat eine Braunfärbung ein, die bei Stärkezusatz sofort einer Blaufärbung Platz machte. Es ist demnach durch das zugesetzte Chlor Jod freigemacht — und zwar macht 1 Molekül Chlor 1 Molekül Jod frei — das seinerseits die Blaufärbung bedingt.

$$Cl_2 + 2\ KJ = 2\ KCl + J_2$$

Der Jodgehalt wurde nun durch Titrieren mit $^1/_{10}$-Natriumhyposulfit (24,8 g in 1 l) bestimmt. 1 ccm $^1/_{10}$-Natriumhyposulfit bindet 12,65 mg Jod, entspricht somit 3,54 mg Chlor. Die Umsetzung geschieht nach der Formel:

$$2\ Na_2S_2O_3 + J_2 = Na_2S_4O_6 + 2\ NaJ.$$

Wie die einzelnen Kolben nach der Chlorierung weiter behandelt wurden, werde ich weiter unten auseinanderzusetzen haben, da die einzelnen Versuchsreihen in der Beziehung Verschiedenheiten zeigen, wenigstens die erste gegenüber der zweiten und dritten. Im einzelnen gestalten sich meine Versuche folgendermaßen:

I. Versuchsreihe.

Das Hauptgewicht ist auf die Art und Weise, die nach der Sterilisation noch lebensfähig gebliebenen Keime nachzuweisen, zu legen. Auch in dieser Beziehung lehnt sich meine erste Versuchsreihe nahe an die Versuchsanordnung Lode's an.

War die Sterilisation und die Neutralisation vorgenommen, so erfolgte die Entnahme von 2 ccm des behandelten Wassers, welche zu Gelatineplatten ausgegossen wurden. Diese Platten blieben 8 Tage bei Zimmertemperatur stehen und erst am 8. Tage erfolgte die Nachschau. Die gewachsenen Kolonieen auf den Wasserplatten wurden ausgezählt, die Chlolera- und Typhusplatten auf Keime untersucht, aber nicht ausgezählt, da mir die Zahl der zugesetzten Cholera- und Typhuskeime auch unbekannt war.

Wenn ich Versuche nach dieser Methode anstellte, so geschah es lediglich aus dem Grunde, um mir Gewißheit darüber zu verschaffen,

ob das in unserem Institute geübte Verfahren, wie ich es in der 2. und 3. Versuchsreihe angewandt habe, wirklich die bis heute vollkommenste Methode darstellt, um auch nur wenige Keime in einer Flüssigkeit nachzuweisen, vorausgesetzt, daß wir nur sterile Reagentien verwenden.

Ich ließ also zuerst das Chlor in der geschilderten Weise auf Wasserbakterien einwirken.

Tabelle 1, 2 und 3 mögen das Resultat veranschaulichen.

Tabelle 1. A

Einwirkung von Chlor auf Wasserbakterien.

Versuch 1—6, angesetzt am 15. Januar 1902. Keimzählung nach Chloreinwirkung am 23. Januar 1902. — Versuch 7—12, angesetzt am 16. Januar 1902. Keimzählung nach Chloreinwirkung am 24. Januar 1902.

Lfde. No.	Art des verwandten Wassers	Versuchsmenge in Litern	Zugesetzte Chlorkalkmenge in Gramm	Einwirkungsdauer in Minuten	Keimzahl des Wassers vor der Chloreinwirkung	Keimzahl des Wassers nach der Chloreinwirkung
1	Leitung	1	0,15 = 33 mg Chlor	120	174	0
2	"	1	0,15 = 33 " "	120	218	0
3	Brunnen	1	0,15 = 33 " "	120	1068	0
4	"	1	0,15 = 33 " "	120	1113	0
5	Lahn	1	0,15 = 33 " "	120	100	0
6	Leitung	1	0,15 = 33 " "	120	1360	0
7	"	1	0,15 = 33 " "	30	108	0
8	Brunnen	1	0,15 = 33 " "	30	724	0
9	Leitung	1	0,15 = 33 " "	30	77	0
10	Lahn	1	0,15 = 33 " "	30	914	0
11	"	1	0,15 = 33 " "	30	1013	0
12	Leitung	1	0,15 = 33 " "	30	210	0

Tabelle 2. A

Einwirkung von Chlor auf Wasserbakterien.

Versuch 1—6, angesetzt am 17. Januar 1902. Keimzählung nach der Chlorierung am 25. Januar 1902. — Versuch 7—18, angesetzt am 18. Januar 1902. Keimzählung nach der Chlorierung am 26. Januar 1902.

Lfde. No.	Art des verwandten Wassers	Versuchsmenge in Litern	Zugesetzte Chlorkalkmenge in Gramm	Einwirkungsdauer in Minuten	Keimzahl des Wassers vor der Chloreinwirkung	Keimzahl des Wassers nach der Chloreinwirkung
1	Leitung	1	0,15 = 33 mg Chlor	20	48	0
2	Ketzerbachwasser	1	0,15 = 33 " "	20	10 780	0
3	Brunnen	1	0,15 = 33 " "	20	862	0
4	Leitung	1	0,15 = 33 " "	20	1 918	9
5	Lahn	1	0,15 = 33 " "	20	1 047	0
6	Leitung	1	0,15 = 33 " "	20	35	15
7	"	1	0,15 = 33 " "	15	66	0
8	Ketzerbachwasser	1	0,15 = 33 " "	15	11 227	0
9	Brunnen	1	0,15 = 33 " "	15	1 214	0
10	Leitung	1	0,15 = 33 " "	15	96	0
11	Lahn	1	0,15 = 33 " "	15	1 138	0
12	Leitung	1	0,15 = 33 " "	15	36	0
13	"	1	0,15 = 33 " "	10	21	0
14	Ketzerbachwasser	1	0,15 = 33 " "	10	14 333	0
15	Brunnen	1	0,15 = 33 " "	10	1 147	0
16	Leitung	1	0,15 = 33 " "	10	27	0
17	Lahn	1	0,15 = 33 " "	10	1 055	0
18	Leitung	1	0,15 = 33 " "	10	30	0

Tabelle 3. A

Einwirkung von Chlor auf Wasserbakterien.

Versuch 1—7, angesetzt am 10. April 1902. Keimzählung nach der Chloreinwirkung am 17. April 1902. — Versuch 8—14, angesetzt am 11. April 1902. Keimzählung nach der Chloreinwirkung am 18. April 1902.

Lfde. No.	Art des verwandten Wassers	Versuchsmenge in Litern	Zugesetzte Chlorkalkmenge in Gramm	Einwirkungsdauer in Minuten	Keimzahl des Wassers vor der Chloreinwirkung	Keimzahl des Wassers nach der Chloreinwirkung
1	Lahn	1	0,15 = 33 mg Chlor	5	11 340	2
2	„	1	0,15 = 33 „ „	5	9 450	1
3	Ketzerbach	1	0,15 = 33 „ „	5	28 980	0
4	„	1	0,15 = 33 „ „	5	23 716	0
5	Leitung	1	0,15 = 33 „ „	5	8 580	0
6	„	1	0,15 = 33 „ „	5	15 630	0
7	„	1	0,15 = 33 „ „	5	12 550	3
8	Ketzerbach	1	0,15 = 33 „ „	3	2 100	12
9	„	1	0,15 = 33 „ „	3	2 380	38
10	Lahn	1	0,15 = 33 „ „	3	700	218
11	„	1	0,15 = 33 „ „	3	630	15
12	Leitung	1	0,15 = 33 „ „	3	120	3
13	„	1	0,15 = 33 „ „	3	217	1
14	„	1	0,15 = 33 „ „	3	98	0

Es wirkten auf Leitungsbrunnen, Lahn- und Ketzerbachwasser ein:

0,15 g aus der Apotheke bezogenen Chlorkalkes während 120 Minuten in 6 Versuchen
0,15 „ „ „ „ „ „ „ 30 „ „ 6 „
0,15 „ „ „ „ „ „ „ 20 „ „ 6 „
0,15 „ „ „ „ „ „ „ 15 „ „ 6 „
0,15 „ „ „ „ „ „ „ 10 „ „ 6 „
0,15 „ „ „ „ „ „ „ 5 „ „ 7 „
0,15 „ „ „ „ „ „ „ 3 „ „ 7 „

Die Titerbestimmung ergab in 0,15 g 33 mg Chlor.

Das Resultat überraschte mich nach den von Lode und vielen anderen Autoren in gleicher Weise angestellten Versuchen gar nicht.

Bei einer Einwirkungsdauer von 120 Minuten bis herab zu 10 Minuten waren sämtliche Platten mit Ausnahme zweier steril geblieben, trotzdem der Keimgehalt des Wassers vor der Chloreinwirkung manchmal ein sehr hoher war.

Anders war das Resultat der Tabelle 3. Die Einwirkungszeit war auf 5 resp. 3 Minuten verringert, um die Grenze der Wirksamkeit von 0,15 g Chlorkalk kennen zu lernen. Bei einer Einwirkungszeit von 5 Minuten waren in 3 von 7 Versuchen einige wenige Keime gewachsen. Wenn die Keimzahl nach der Chloreinwirkung im Verhältnis zu der vor dem Chlorzusatz auch eine verschwindend geringe ist:

11 340 zu 2 (Versuch 1)
9 450 „ 1 („ 2)
12 550 „ 3 („ 7)

so sind wir doch berechtigt, anzunehmen, daß wir der absoluten Grenze der Wirksamkeit äußerst nahe sind, wenn wir nicht schon die Einwirkungsdauer von 5 Minuten als untere Grenze gelten lassen wollen. Ich ließ deshalb in 7 Versuchen das Chlor nur 3 Minuten einwirken und konnte konstatieren, daß mit Ausnahme von Versuch 14, der auch vor der Chloreinwirkung nur 98 Keime pro Kubikcentimeter im Leitungswasser aufzuweisen hatte, in sämtlichen Fällen mehr oder weniger Keime gewachsen waren.

Ich komme nun zu den Versuchen mit Choleravibrionen. Die Versuchsanordnung blieb dieselbe.

Tabelle 4. A

Einwirkung von Chlor auf Choleravibrionen.

Angesetzt am 5. Mai 1902.

Laufende No.	Menge d. verwandt. steril. Wassers in Lit.	Zugesetzte Cholera-kultur	Zugesetzte Chlorkalkmenge in g	Einwirkungsdauer in Minuten	Resultat a auf der Gelatineplatte	b auf Agaragar	c in Gelatine (Stich)	d in Peptonwasser	Bemerkungen
1	1	1 Agarröhrch.	0,15 = 29 mg Chlor	5	+	+	+	+	
2	1	1 „	0,15 = 29 „ „	5	—	—			
3	1	1 „	0,15 = 29 „ „	10	—	—			
4	1	1 „	0,15 = 29 „ „	10	—	—			
5	1	1 „	0,15 = 29 „ „	15	—	—			
6	1	1 „	0,15 = 29 „ „	15	—	—			
7	1	1 „	0,15 = 29 „ „	20	+	+	+	+	
8	1	1 „	0,15 = 29 „ „	20	—	—			
9	1	1 „	0,15 = 29 „ „	30	—	—			
10	1	1 „	0,15 = 29 „ „	30	+	+	+	+	
11	1	1 „	0,15 = 29 „ „	40	—	—			
12	1	1 „	0,15 = 29 „ „	40	—	—			
13	1	1 „	0,15 = 29 „ „	60	—	—			
14	1	1 „	0,15 = 29 „ „	60	—	—			
15	1	1 „	0,15 = 29 „ „	60	—	—			

Angestellt wurden 15 Versuche mit einer Einwirkungsdauer von 5—60 Minuten und einem Chlorgehalt von 29 mg pro Liter. Es wurden nicht nur Gelatineplatten nach der Chlorierung des Wassers gegossen, sondern gleichzeitig noch aus jedem Kolben 3 Oesen auf später bei 37° gehaltenen, schräg erstarrten Agar übertragen. Das Ergebnis der Agarkulturen stimmte in jedem Falle mit dem der Gelatineplatte überein; natürlich wurde in diesen Fällen stets nur die Gelatineplatte weiter behandelt. Von einer einzeln liegenden, charakteristischen Kolonie wurde etwas Material in Peptonwasser und in Gelatine (Stich) übertragen. Erst wenn das Wachstum in Gelatine ein für Cholera typisches war und wenn das Peptonwasser auf Zusatz von konzentrierter Schwefelsäure Rotreaktion zeigte, wurde die Diagnose Cholera gestellt.

Auf diese Weise gelang es mir, nur in 3 Versuchen Cholerakeime nach der Chloreinwirkung noch nachzuweisen:

Versuch 1 = Einwirkungszeit 5 Minuten
„ 7 = „ 20 „
„ 10 = „ 30 „

Es handelte sich in diesen Fällen immer nur um wenige Kolonieen.

Auch diese Versuche fielen günstig aus. Nur waren bei mir die Vibrionen erst sicher bei einer Einwirkung des Chlors während 40 Minuten abgetötet.

Schließlich wurde nach Lode's Vorschrift noch die Einwirkung von Chlor auf Typhusbacillen geprüft.

Es wurden laut Tabelle 5 im ganzen 15 Versuche gemacht, in denen das Chlor, in diesem Falle 32 mg pro Liter, ähnlich wie bei den vorhergehenden Versuchen mit Choleravibrionen, 5—60 Minuten zur Ein-

Tabelle 5. A

Einwirkung von Chlor auf Typhusbacillen.

Angesetzt am 5. Mai 1902.

Laufende No.	Menge d. verwandt. steril. Wassers in Lit.	Zugesetzte Typhuskultur	Zugesetzte Chlorkalkmenge in g	Einwirkungsdauer in Minuten	Resultat a auf der Gelatineplatte	Resultat b auf Agaragar	Resultat c in Traubenzuckeragar	Bemerkungen
1	1	1 Agarröhrch.	0,15 = 32 mg Chlor	5	+	+	+	
2	1	1 „	0,15 = 32 „ „	5	+	+	+	
3	1	1 „	0,15 = 32 „ „	10	—	—		
4	1	1 „	0,15 = 32 „ „	10	+	+	+	
5	1	1 „	0,15 = 32 „ „	15	—	—		
6	1	1 „	0,15 = 32 „ „	15	—	—		
7	1	1 „	0,15 = 32 „ „	20	—	—		
8	1	1 „	0,15 = 32 „ „	20	—	—		
9	1	1 „	0,15 = 32 „ „	30	—	—		
10	1	1 „	0,15 = 32 „ „	30	—	—		
11	1	1 „	0,15 = 32 „ „	40	—	—		
12	1	1 „	0,15 = 32 „ „	40	—	—		
13	1	1 „	0,15 = 32 „ „	60	—	—		
14	1	1 „	0,15 = 32 „ „	60	—	—		
15	1	1 „	0,15 = 32 „ „	60	—	—		

wirkung gelangte. Der Nachweis der Typhusbacillen wurde derart geführt, daß von einer einzeln liegenden, typischen Gelatineplattenkolonie ein Stich in Traubenzuckeragar gemacht wurde. Trat bei Körpertemperatur Wachstum im ganzen Stiche ohne Gasbildung ein, so war ich berechtigt, diese Keime für Typhusbacillen zu halten, zumal in all meinen Versuchen die pathogenen Bakterien, also die Choleravibrionen und die Typhusbacillen, 1 l sterilen Wassers zugesetzt waren.

Das Resultat überraschte mich insofern, als schon bei einer Einwirkungsdauer von 15 Minuten keine Typhuskeime nach dem oben beschriebenen Verfahren mehr nachweisbar waren, auch auf Agar nicht, welche Kulturen in allen Fällen nebenher angelegt wurden. Es wunderte mich das um so mehr, als die Typhusbacillen bedeutend widerstandsfähigere Bakterien darstellen, als die wenig resistenten Choleravibrionen, die noch bei einer Einwirkung des Chlors während 30 Minuten in einem Falle gewachsen waren.

Betrachten wir jedoch den Chlorgehalt der sowohl bei den Cholera- als auch bei den Typhusversuchen verwandten Chlorkalkmenge, so sehen wir, daß bei den ersteren Prüfungen ein Chlorgehalt von 29 mg pro Liter zur Einwirkung gelangte, in den letzteren aber 32. Auf dieses Plus von 3 mg in den letzten Versuchen kann auch das bessere Resultat zurückgeführt werden. Es ist dies auch ein Beweis, daß es gewagt ist, für eine Sterilisation von Trinkwasser eine gewisse Menge einer in einer Apotheke oder in einer Droguerie käuflichen und zumal so sehr veränderlichen Substanz, wie sie der Chlorkalk darstellt, zu empfehlen. Nicht einmal verschiedene Mengen desselben Pakets Chlorkalks ergaben nach meinen Versuchen die gleichen Chlormengen. Viel weniger ist das natürlich von den gleichen Mengen verschiedener Präparate zu erwarten.

Es war mir, wie aus der Tabelle 5 zu ersehen ist, nur in 3 Fällen möglich, Typhuskeime nach der Chloreinwirkung noch zum Wachstum zu bringen, und zwar

in Versuch 1 Einwirkungsdauer 5 Minuten
„ „ 2 „ 5 „ und
„ „ 4 „ 10 „

Damit habe ich meine erste Versuchsreihe abgeschlossen.

Nach den Ergebnissen derselben kann ich die Resultate fast sämtlicher Autoren, die sich mit der Chlorkalksterilisation bislang beschäftigt haben, vollauf bestätigen.

Wäre ich bei meinen Versuchen hier stehen geblieben und hätte ich mich zwecks Nachprüfung der Traube-Lode'schen Wassersterilisation mit dieser ersten Versuchsreihe begnügt und nur auf das Lodesche Verfahren der Abimpfung beschränkt, so würde mein Urteil über die Chlorkalkdesinfektion von Trinkwasser demnach fast ebenso günstig lauten wie das Lode's und anderer Autoren.

II. Versuchsreihe.

Anders gestaltete sich das Resultat, wenn ich die Keime im Versuchswasser nach der Chloreinwirkung sofort unter günstige Wachstumsbedingungen brachte.

Die 1 l der bekannten Wasserarten enthaltenden Kolben sowohl als die in oben geschilderter Weise hergestellten Cholera- und Typhuswässer wurden zunächst in derselben Weise behandelt wie die in der ersten Versuchsreihe. Erst wenn das Neutralisationssalz bestimmte Zeit eingewirkt hatte, folgte die Abweichung dieser Versuchsreihe von der ersten. Statt 2 ccm des mit Chlor behandelten und wieder neutralisierten Wassers zur Gelatineplatte auszugießen und 3 Oesen auf Agarnährboden zu übertragen, setzte ich dem betreffenden Wasser soviel einer von mir hergestellten konzentrierten Peptonkochsalzlösung zu, daß im Kolben eine 1-proz. Peptonlösung entstand. Jetzt haben die im Kolben befindlichen Bakterien alles, was sie zu ihrem Wachstum und zu ihrer Vermehrung nötig haben. Meine Versuche haben gezeigt, daß wir mit dem Pepton völlig auskommen, und zwar nicht allein zum Nachweise von Choleravibrionen, sondern auch sämtlicher anderer Bakterienarten, die gewöhnlich als Testobjekte dienen. Eine Notwendigkeit ist es natürlich, daß die zuzusetzende Peptonlösung in völlig sterilem Zustande dem Kolbeninhalte beigefügt wird, wovon man sich durch Kontrollagarröhrchen in jedem Falle überzeugen muß. Ich habe das stets gethan und bin überzeugt, keine fremdartigen Bakterien mit dem Pepton in das Versuchswasser übertragen zu haben. Hatte ich das Versuchswasser in der beschriebenen Weise in eine 1-proz. Peptonlösung umgewandelt, so kamen die Kolben für 8 Tage in den Brütofen, wo sie bei Körpertemperatur gehalten wurden. Dann konnte ich sicher sein, daß die Bakterien, die noch lebensfähig waren, sich in der angegebenen Zeit derart vermehrt hatten, daß es keine Mühe machte, sie nachzuweisen. Es wurden jetzt 2 ccm der Peptonlösung zu Gelatineplatten ausgegossen resp. 3 Oesen wieder auf Agar übertragen. Weiterhin wurde verfahren wie in der ersten Versuchsreihe.

Zunächst wurde nach dieser Methode wiederum die Einwirkung von Chlor auf Wasserbakterien studiert.

In Tabelle 6 sind 15 Versuche registriert, die mit Leitungs-, Lahn- und Ketzerbachwasser angestellt wurden. Die Einwirkungsdauer

Tabelle 6. B

Einwirkung von Chlor auf Wasserbakterien.

Angesetzt am 6. Mai 1902.

Lfde. No.	Art des verwandten Wassers	Versuchsmenge in Litern	Zugesetzte Chlorkalkmenge in Gramm	Einwirkungsdauer in Minuten	Keimzahl des Wassers vor der Chloreinwirkung	Keimzahl des Wassers nach der Chloreinwirkung
1	Leitung	1	0,15 = 34 mg Chlor	5	15	unzählbar
2	„	1	0,15 = 34 „ „	5	11	„
3	„	1	0,15 = 34 „ „	10	6	3850
4	„	1	0,15 = 34 „ „	10	3542	1208
5	„	1	0,15 = 34 „ „	15	2002	1540
6	„	1	0,15 = 34 „ „	15	616	0
7	Lahn	1	0,15 = 34 „ „	20	19404	860
8		1	0,15 = 34 „ „	20	1694	17637
9	„	1	0,15 = 34 „ „	30	2156	1232
10		1	0,15 = 34 „ „	30	4620	897
11	Ketzerbach	1	0,15 = 34 „ „	40	1078	0
12	„	1	0,15 = 34 „ „	40	2123	0
13	„	1	0,15 = 34 „ „	60	18172	unzählbar
14	„	1	0,15 = 34 „ „	60	22790	962
15	„	1	0,15 = 34 „ „	60	36111	0

schwankte zwischen 5 und 60 Minuten, der Chlorgehalt betrug 34 mg pro Liter. Nur in 4 Versuchen war nach der Chloreinwirkung Sterilität eingetreten.

Versuch 6 Einwirkungsdauer 15 Minuten
„ 11 „ 40 „
Versuch 12 Einwirkungsdauer 40 Minuten und
„ 15 „ 60 „

In sämtlichen anderen Fällen war eine relativ große Anzahl Kolonieen gewachsen. Hierher gehören:

Versuch 1, 2, 3, 8 und 13, in welch letzterem Versuche das Chlor sogar eine ganze Stunde zur Einwirkung gekommen war. Andererseits ist nicht zu leugnen, daß in vielen Fällen infolge der Chloreinwirkung eine mehr oder minder große Keimverringerung eingetreten ist. In Versuch 15 war nach einer Einwirkungsdauer von 60 Minuten von 36111 Keimen kein einziger mehr zur Entwickelung gekommen, in Versuch 7 bei 20 Minuten dauernder Einwirkung statt 19404 nur 860. Immerhin berechtigen diese Versuche zu dem Schlusse, daß das Chlor in der angewandten Form imstande ist, in einem auch sehr beschmutzten Wasser, wie in unserem Falle das Ketzerbachwasser ist, die Keimzahl wesentlich herabzusetzen, Keimfreiheit jedoch auch bei 1-stündiger Einwirkungsdauer nicht herbeizuführen. Die Versuche wurden in gleicher Weise wiederholt; es kamen zur Einwirkung 33 mg Chlor pro 1 l. Das Resultat blieb dasselbe (s. Tabelle 7 p. 510).

Ich ließ nun das Chlor — 34 mg pro Liter — bis zu 30 Minuten auf die Choleravibrionen, die 1 l sterilen Wassers zugesetzt waren, einwirken. Auch hier wurden neben der Gelatineplatte gleichzeitig Agarkulturen angelegt (s. Tabelle 8 p. 510).

Wir sehen aus der Tabelle, daß in einer Anzahl Versuchen die Cholerakeime vollständig vernichtet sind, im anderen wieder nicht. Bei einer Einwirkungsdauer von 5 Minuten waren 2mal sehr zahlreiche Vibrionen gewachsen, desgleichen einige wenige Kolonieen bei einer Einwirkungszeit

Tabelle 7. B

Einwirkung von Chlor auf Wasserbakterien.

Angesetzt am 8. Mai 1902.

Lfde. No.	Art des verwandten Wassers	Versuchsmenge in Litern	Zugesetzte Chlorkalkmenge in Gramm	Einwirkungsdauer in Minuten	Keimzahl des Wassers vor der Chloreinwirkung	Keimzahl des Wassers nach der Chloreinwirkung
1	Leitung	1	0,15 = 33 mg Chlor	5	15	1650
2	"	1	0,15 = 33 " "	10	9	540
3	"	1	0,15 = 33 " "	15	14	450
4	Lahn	1	0,15 = 33 " "	20	218	Platte ist flüssig geworden
5	Ketzerbach	1	0,15 = 33 " "	20	12 320	1440
6	Lahn	1	0,15 = 33 " "	30	2 772	unzählbar
7	Ketzerbach	1	0,15 = 33 " "	30	13 124	1200
8	"	1	0,15 = 33 " "	40	8 624	0
9	Lahn	1	0,15 = 33 " "	60	1 232	unzählbar
10	Ketzerbach	1	0,15 = 33 " "	60	10 677	0

Tabelle 8. B

Einwirkung von Chlor auf Choleravibrionen.

Angesetzt am 12. April 1902.

Laufende No.	Menge des verwandt. steril. Wassers in Lit.	Zugesetzte Cholera-kultur	Zugesetzte Chlorkalkmenge in Gramm	Einwirkungsdauer in Minuten	Resultat a auf der Gelatineplatte	b auf Agaragar	c in Gelatine (Stich)	d in Peptonwasser	Bemerkungen
1	1	1 Agarröhrch.	0,15 = 34 mg Chlor	5	+	+	+	+	Kolonieen sehr reichlich
2	1	1 "	0,15 = 34 " "	5	+	+	+	+	do.
3	1	1 "	0,15 = 34 " "	5	—	—	—	—	
4	1	1 "	0,15 = 34 " "	5	—	—	—	—	
5	1	1 "	0,15 = 34 " "	5	?	—	—	—	
6	1	1 "	0,15 = 34 " "	10	—	—	—	—	
7	1	1 "	0,15 = 34 " "	10	—	—	—	—	
8	1	1 "	0,15 = 34 " "	10	?	—	—	—	
9	1	1 "	0,15 = 34 " "	10	—	—	—	—	
10	1	1 "	0,15 = 34 " "	10	?	—	—	—	
11	1	1 "	0,15 = 34 " "	15	+	+	+	+	einige wenige Kolonieen
12	1	1 "	0,15 = 34 " "	15	—	+	+	+	do.
13	1	1 "	0,15 = 34 " "	15	+	+	+	+	do.
14	1	1 "	0,15 = 34 " "	20	—	—	—	—	
15	1	1 "	0,15 = 34 " "	20	+	+	+	+	Kolonieen spärlich vorhanden
16	1	1 "	0,15 = 34 " "	20	+	+	+	+	do.
17	1	1 "	0,15 = 34 " "	30	—	+	+	+	do.
18	1	1 "	0,15 = 34 " "	30	—	—	—	—	
19	1	1 "	0,15 = 34 " "	30	—	—	—	—	

von 15 Minuten in 3 Fällen
" 20 " " 2 " und
" 30 " " 1 Fall

In Versuch 5, 8 und 10 waren auf der Gelatineplatte einige Kolonieen gewachsen, die sich jedoch als nicht dem Choleravibrio angehörig er-

gaben — wahrscheinlich handelte es sich um Keime aus der Luft. In Versuch 12 und 17 waren auf der Gelatineplatte keine Keime gewachsen, hingegen zeigte sich auf der Agaroberfläche sehr lückenhaftes Wachstum.

Die Anzahl der Cholerakeime war augenscheinlich in den Fällen, in denen sie überhaupt nachweisbar gewesen waren, stark reduziert.

Diese Versuchsreihe bot insofern noch Bemerkenswertes, als in sämtlichen Fällen auch da, wo keine Vibrionen mehr durch unser Verfahren zur Entwickelung gekommen waren, das Wasser in den Versuchskolben noch nach 1-stündiger Sterilisation im strömenden Dampfe auf Zusatz von konzentrierter Schwefelsäure Rotreaktion zeigte. Die Wiederholung dieser Versuche fiel, wie aus Tabelle 9 hervorgeht, noch etwas schlechter aus. Erst nach 60 Minuten dauernder Chloreinwirkung von 32 mg waren sämtliche Vibrionen vernichtet.

Tabelle 9. B

Einwirkung von Chlor auf Choleravibrionen.

Angesetzt am 5. Mai 1902.

Laufende No.	Menge des verwandt. steril. Wassers in Lit.	Zugesetzte Cholera-kultur	Zugesetzte Chlor-kalkmenge in Gramm	Einwirkungsdauer in Minuten	Resultat a	b	c	d	Bemerkungen
					auf der Gelatineplatte	auf Agaragar	in Gelatine (Stich)	in Peptonwasser	
1	1	1 Agarröhrch.	0,15 = 32 mg Chlor	5	+		+	+	Rotreaktion im Versuchskolben
2	1	1 „	0,15 = 32 „ „	10	+		+	+	do.
3	1	1 „	0,15 = 32 „ „	15	+		+	+	do.
4	1	1 „	0,15 = 32 „ „	20	+		+	+	keine Rotreaktion im Versuchskolben
5	1	1 „	0,15 = 32 „ „	20	+		+	+	Rotreaktion
6	1	1 „	0,15 = 32 „ „	30	+		+	+	keine Rotreaktion
7	1	1 „	0,15 = 32 „ „	30	+		+	+	do.
8	1	1 „	0,15 = 32 „ „	40	—	+	+	+	Rotreaktion im Versuchskolben
9									
10	1	1 „	0,15 = 32 „ „	60	—	—			do.
	1	1 „	0,15 = 32 „ „	60	—	—			do.

Schließlich ließ ich das Chlor noch auf filtrierte, in Bouillon aufgeschwemmte Choleravibrionen wirken. Die Filtration geschah durch ein doppeltes steriles Fließpapierfilter in sterile Reagenzgläser. Wie ich in meiner Arbeit über die Schumburg'sche Wassersterilisation schon erwähnt habe, glaubte Schumburg einige Mißerfolge in seinen Versuchen darauf zurückführen zu können, daß die von dem Agar abgestreiften Kulturen stets Bröckelchen des Nährbodens enthielten, die bei seinem Verfahren der Trinkwasserreinigung mit Bromeiweiß umschlossen würden, so daß die im Inneren des Bröckelchens noch lebenden und vom Brom nicht abgetöteten Bakterien in neuer Nährflüssigkeit zur Entwickelung gelangen könnten.

Ein ähnliches könnte nicht mit Unrecht bei der Chlorkalksterilisation angenommen werden. Aus diesem Grunde habe ich die folgenden 10 Versuche mit filtrierten Cholerakulturen angestellt.

Tabelle 10. B

Einwirkung von Chlor auf Choleravibrionen (nach Filtration der in Bouillon aufgeschwemmten Kulturen).

Angesetzt am 13. April 1902.

Laufende No.	Menge des verwandt. steril. Wassers in Lit.	Zugesetzte Cholera-kultur	Zugesetzte Chlor-kalkmenge in Gramm	Einwirkungsdauer in Minuten	Resultat a auf der Gelatineplatte	Resultat b auf Agaragar	Resultat c in Gelatine (Stich)	Resultat d in Peptonwasser	Bemerkungen
1	1	1 Agarröhrch.	0,15 = 35 mg Chlor	5	+	+	+	+	Sehr zahlreiche Kolonieen
2	1	1 „	0,15 = 35 „ „	5	+	—	+	+	do.
3	1	1 „	0,15 = 35 „ „	10	?	+	+	+	do.
4	1	1 „	0,15 = 35 „ „	10	—	—	—	—	do.
5	1	1 „	0,15 = 35 „ „	15	+	+	+	+	Kolon. sehr spärlich
6	1	1 „	0,15 = 35 „ „	15	+	+	+	+	Kolon. sehr reichlich
7	1	1 „	0,15 = 35 „ „	20	+	+	+	—	bei diesem Versuch war statt Peptonwasser Bouillon genommen
8	1	1 „	0,15 = 35 „ „	20	+	+	+	+	zahlreiche Keime
9	1	1 „	0,15 = 35 „ „	30	+	+	+	+	auf der Gelatineplatte unzählbar viele Keime
10	1	1 „	0,15 = 35 „ „	30	+	+	+	+	wenig Keime

Diese Versuche sind jedoch trotz der Einwirkung von 35 mg Chlor völlig negativ ausgefallen.

Nur in einem einzigen Falle waren am 8. Beobachtungstage weder auf der Gelatineplatte noch auf Agar Cholerakeime zur Entwickelung gekommen, und zwar in Versuch 4, in dem das Chlor 10 Minuten eingewirkt hatte. In allen übrigen Versuchen waren meist sehr reichliche Kolonieen sichtbar, sogar dann, wenn eine 30 Minuten lange Chloreinwirkung vorangegangen war. In Versuch 3 war auf der Gelatineplatte keine Cholerakolonie aufzufinden, dagegen desto reichlicher auf dem Agar. Umgekehrt war in Versuch 2 die Gelatineplatte übersät mit Cholerakeimen, dagegen blieb der Agar steril. Ich kann dies nicht anders erklären als so, daß ich bei der ungleichen Verteilung der Vibrionen im Peptonwasser zufällig an eine bakterienfreie Stelle bei der Entnahme gekommen bin.

Durch die Filtration der in Bouillon aufgeschwemmten Cholerakulturen sind demnach die Resultate nicht bessere geworden.

Ich gehe nun über zu den letzten Versuchen dieser Reihe, die die Wirkung des Chlors auf Typhusbacillen veranschaulichen sollen. Wir haben gesehen, daß dieselben Versuche der ersten Reihe recht gut ausgefallen waren.

Ich lasse meine eigenen Resultate in den Tabellen 11 und 12 folgen.

Tabelle 11 enthält 20 Versuche. Zugesetzte Chlormenge 29 mg pro Liter. Ich hatte in diesem Falle mit den Gelatineplatten nicht gleichzeitig Agarkulturen angelegt. Ich habe deshalb nach dem Gießen der Platten die Kolben noch so lange aufbewahrt, bis entweder auf der Gelatineplatte Coli-ähnliche Kolonieen gewachsen waren und diese sich

Tabelle 11. B

Einwirkung von Chlor auf Typhusbacillen.

Angesetzt am 15. April 1902.

Laufende No.	Menge des verwandt. steril. Wassers in Lit.	Zugesetzte Typhus-kultur	Zugesetzte Chlor-kalkmenge in Gramm	Einwirkungsdauer in Minuten	Resultat a auf der Gelatineplatte	Resultat b auf Agaragar	Resultat c in Traubenzuckeragar	Bemerkungen
1	1	1 Agarröhrch.	0,15 = 29 mg Chlor	5	?	+	+	Gelatineplatte ist flüssig geworden
2	1	1 „	0,15 = 29 „ „	5	+		+	
3	1	1 „	0,15 = 29 „ „	10	+		+	
4	1	1 „	0,15 = 29 „ „	10	+		+	
5	1	1 „	0,15 = 29 „ „	10	+		+	
6	1	1 „	0,15 = 29 „ „	15	+		+	
7	1	1 „	0,15 = 29 „ „	15	+		+	
8	1	1 „	0,15 = 29 „ „	15	+		+	
9	1	1 „	0,15 = 29 „ „	20	—	—		
10	1	1 „	0,15 = 29 „ „	20	+		+	
11	1	1 „	0,15 = 29 „ „	20	+		+	
12	1	1 „	0,15 = 29 „ „	30	+		+	
13	1	1 „	0,15 = 29 „ „	30	+		+	
14	1	1 „	0,15 = 29 „ „	30	+		+	
15	1	1 „	0,15 = 29 „ „	40	+		+	
16	1	1 „	0,15 = 29 „ „	40	+		+	
17	1	1 „	0,15 = 29 „ „	40	—	—		
18	1	1 „	0,15 = 29 „ „	60	—	+	+	
19	1	1 „	0,15 – 29 „ „	60	—	—		
20	1	1 „	0,15 = 29 „ „	60	—	—		

Tabelle 12. B

Einwirkung von Chlor auf Typhusbacillen.

Angesetzt am 9. Mai 1902.

Laufende No.	Menge des verwandt. steril. Wassers in Lit.	Zugesetzte Typhus-kultur	Zugesetzte Chlor-kalkmenge in Gramm	Einwirkungsdauer in Minuten	Resultat a auf der Gelatineplatte	Resultat b auf Agaragar	Resultat c in Traubenzuckeragar	Bemerkungen
1	1	1 Agarröhrch.	0,15 = 33 mg Chlor	5	+		+	viele Keime
2	1	1 „	0,15 = 33 „ „	10	+		+	wenige Keime
3	1	1 „	0,15 = 33 „ „	15	+		+	do.
4	1	1 „	0,15 = 33 „ „	20	+		+	do.
5	1	1 „	0,15 = 33 „ „	20	+		+	
6	1	1 „	0,15 = 33 „ „	30	—	—		
7	1	1 „	0,15 = 33 „ „	30	+		+	
8	1	1 „	0,15 = 33 „ „	40	+		+	einige wenige Keime
9	1	1 „	0,15 = 33 „ „	60	+		+	zahlreiche Keime
10	1	1 „	0,15 = 33 „ „	60	+		+	wenige Keime

bei Stich in Traubenzuckeragar als Typhus erwiesen hatten, oder aber die Gelatine nach 2 Tagen noch steril war. Im letzteren Falle wurden nach 2 Tagen 3 Oesen auf schrägen Agar übertragen. Blieb auch auf diesem

das Wachstum aus, so wurde angenommen, daß sämtliche Typhuskeime durch den Chlorkalk vernichtet seien. So wurde verfahren in Versuch 9, 17, 18, 19 und 20. In Versuch 1 mußte auf Agar noch übergeimpft werden, da die Gelatineplatte flüssig geworden war.

Aus den Versuchen geht hervor, daß eine bis zu 40 Minuten währende Einwirkung des Chlorkalkes für den Typhusbacillus ohne Bedeutung ist. Der einzige Versuch, in dem keine Eberth'schen Bacillen sich nach 20 Minuten dauernder Einwirkungszeit mehr haben nachweisen lassen (Versuch 9), fällt bei der Bewertung der Desinfektionskraft des Chlors auf Typhusbacillen wenig oder gar nicht ins Gewicht, ebenso nicht Versuch 17 mit seiner Einwirkungszeit von 40 Minuten, da die Versuche 15 und 16 mit derselben Einwirkungsdauer eine ungeheuer große Anzahl Keime noch entwickelt hatten. Anders war es, wenn ich die Typhusbacillen 1 Stunde dem Chlor aussetzte. Da war es mir in 2 Fällen gar nicht möglich, noch Typhusbacillen aus dem Kolben herauszuzüchten, in einem Falle (Versuch 18) war ein sehr lückenhaftes Wachstum nur auf Agar eingetreten.

Laut Tabelle 12 hingegen haben sich die Typhuskeime mit Ausnahme eines Falles, wo nach 30 Minuten kein Wachstum mehr eingetreten war, in allen Versuchen, auch während einer 60 Minuten langen Einwirkungszeit dem Chlor (33 mg) gegenüber äußerst resistent erwiesen.

Den Schluß dieser Reihe bilden die Versuche mit filtrierten Typhusbouillonkulturen.

Tabelle 13. B

Einwirkung von Chlor auf Typhusbacillen (nach Filtrieren der in Bouillon aufgeschwemmten Kulturen).

Angesetzt am 16. April 1902.

Laufende No.	Menge des verwandt. steril. Wassers in Lit.	Zugesetzte Typhuskultur	Zugesetzte Chlorkalkmenge in Gramm	Einwirkungsdauer in Minuten	Resultat a: auf der Gelatineplatte	b: auf Agaragar	c: in Traubenzuckeragar	Bemerkungen
1	1	1 Agarröhrch.	0,15 = 36 mg Chlor	5	+		+	
2	1	1 "	0,15 = 36 " "	10	+		+	
3	1	1 "	0,15 = 36 " "	10	+		+	
4	1	1 "	0,15 = 36 " "	15	+		+	
5	1	1 "	0,15 = 36 " "	15	+		+	
6	1	1 "	0,15 = 36 " "	20	—	—		
7	1	1 "	0,15 = 36 " "	20	+		+	
8	1	1 "	0,15 = 36 " "	30	+		+	
9	1	1 "	0,15 = 36 " "	40	—	—		
10	1	1 "	0,15 = 36 " "	60	+		+	

Die Filtration der 24-stündigen Kultur geschah in der bekannten Weise. Agarkulturen anzulegen, war nur in 2 Fällen nötig, jedoch auch hier ohne Erfolg, da auf Agar keine Keime gewachsen waren (Versuch 6 und 10). Sonst waren auf allen Gelatineplatten reichlich Typhuskolonieen zur Entwickelung gekommen, selbst bei 60 Minuten dauernder Einwirkungszeit. Eingewirkt hatten 36 mg Chlor. Die Filtration hatte also wiederum eher eine Verschlechterung zur Folge gehabt.

Schlußfolgerung aus der zweiten Versuchsreihe:

Die Versuche sind im wesentlichen als negativ ausgefallen zu betrachten, ein Resultat, das dem Lode's u. A. konträr gegenübersteht. Es widerspricht aber auch meinen eigenen Erfolgen in der ersten Versuchsreihe. Da beide Versuchsreihen sich jedoch nur in der Art und Weise der Prüfung auf Sterilität unterscheiden, so stehe ich nicht an, auf Grund der beiden ersten Versuchsreihen zu behaupten, daß die Methode der zweiten Versuchsreihe exakter arbeitet als die bisher bekannte, von mir vergleichsweise bei den ersten Versuchen angewandte. Ich bin nicht weniger davon überzeugt, daß ich auch in den Versuchen der ersten Reihe noch verschiedentlich Bakterien mit dem zweiten Verfahren nachgewiesen hätte, wo jetzt Sterilität verzeichnet steht.

Es steht nach den Mißerfolgen der zweiten Versuchsreihe fest, daß weder saprophytische Wasserbakterien noch pathogene, dem Wasser künstlich beigemengte Mikroorganismen, wie die Choleravibrionen und Typhusbacillen, durch die von Bassenge-Lode angegebene Chlorkalkmenge und in der von den beiden Autoren angegebenen Zeit abgetötet werden. In ihrer Zahl jedoch werden sie sehr reduziert. Ich glaube, daß ich mit einer Einwirkungszeit von 1 Stunde der untersten Grenze der Wirksamkeit von 0,15 g Chlorkalk ziemlich nahe gekommen bin. Es bliebe also nur noch zu eruieren übrig, welche Menge unseres Desinficiens in einer für die Praxis zu fordernden Zeit von 10 Minuten die für die Trinkwassersterilisation in Betracht kommenden Bakterien mit Sicherheit unschädlich zu machen imstande ist, und diese Feststellung soll im folgenden Abschnitte ihre Erledigung finden.

III. Versuchsreihe.

Die Technik der Versuchsanordnung blieb dieselbe wie im zweiten Abschnitte dieser Arbeit, mit der kleinen Abweichung, daß mit derselben die der ersten Versuchsreihe kombiniert wurde, d. h. es wurden regelmäßig sowohl vor dem Peptonzusatz, sofort nach der Neutralisation, je 2 ccm des Versuchswassers zu Platten (Gelatine und Agar) gegossen, als auch das in Peptonwasser umgewandelte Versuchsquantum in gleicher Weise nach 8-tägigem Aufenthalte im Brütofen untersucht.

Der Uebersicht halber bezeichne ich im Folgenden die erste Art der Abimpfung mit „A“, die zweite mit „B“. Die Einwirkungsdauer betrug stets 10 Minuten. Zur Einwirkung gelangten zunächst pro 1 l Versuchswasser:

Chlorkalk	0,2 g
Salzsäure	8,0 gtt.
Natriumsulfit	0,4 g

Das Resultat giebt die folgende Tabelle 14 (s. p. 516) wieder.

Die 5 ersten Versuche mit Wasserbakterien zeigen deutlich, daß 0,2 g Chlorkalk mit einem Gehalt von 45 mg wirksamen Chlors die Mehrzahl der im Wasser natürlich vorkommenden Mikroorganismen zu vernichten imstande sind; ein kleiner Prozentsatz erweist auch hier sich ungeheuer resistent; das ergiebt sich zur Evidenz aus der hohen Keimzahl des Peptonwassers und aus der schon früh eingetretenen Bakterientrübung der Nährflüssigkeit, in erster Linie jedoch aus der Keimzahl des Versuchswassers nach vollendeter Sterilisierung, vor dem Peptonzusatz.

Ein ähnlich negatives Ergebnis erzielte ich bei der Abtötung der Choleravibrionen. Am 2. Tage war in jedem Kolben bei Brüttemperatur starke Trübung eingetreten. Trotzdem war es mir unmöglich, in Ver-

Tabelle 14.

No.	Art des verwendeten Wassers	Keimzahl vor dem Versuche auf Gelatine pro ccm (Kontrollplatte)	Keimzahl nach vollendeter Sterilisierung, jedoch vor dem Peptonzusatz, pro ccm (Gießen je 2 ccm zur Platte)		Keimzahl d. Peptonwasserlösung nach 8-tägig. Aufenthalt im Brütofen (Gießen je 2 ccm zur Platte)		Eintritt der Trübung im Peptonwasser im Brütofen
			Gelatineplatte	Agarplatte	Gelatineplatte	Agarplatte	am
1	Leitung	3 472	2	0	533	832	2. Tage
2	Lahn	5 120	10	3	3800	unzählbar	1. „
3	„	4 096	7	12	5052	„	1. „
4	Ketzerbach	23 040	13	21	2112	5830	1. „
5	„	5 888	15	13	2304	1280	1. „
1	Cholerawass.	in Bouill. aufgeschwemmt. Kult. v. 1 Ag.-Röhrch. pro l	0	0	0	0	2. „
2	„	do.	0	0	++	++	2. „
3	„	do.	0	0	+++	+++	2. „
4	„	do.	0	0	+++	+++	2. „
5	„	do.	0	0	+	+	2. „
1	Typhuswass.	do.	0	0	+++	+++	2. „
2	„	do.	0	0	++	++	2. „
3	„	do.	2 Schimmelpilze	0	++	++	2. „
4	„	do.	0	0	+++	+++	3. „
5	„	do.	0	0	++	++	2. „

0 = kein Wachstum, + = spärliches Wachstum, ++ starkes Wachstum, +++ = sehr starkes Wachstum.
Eingewirkt haben 0,2 g Chlorkalk = 45 mg Chlor.

such 1 Vibrionen nachzuweisen; Methode A und B versagten. In Versuch 2—5 kam A, wie zu erwarten war, mit positivem Erfolge zur Anwendung. Dahingegen war in dem Pepton-Cholerawasser am 8. Beobachtungstage eine erschreckende Menge Choleravibrionen vorhanden, sowohl auf der Gelatine als auf Agar. Selbstverständlich wurden von einzeln liegenden Kolonieen Peptonröhrchen geimpft und ein Stich in Gelatine gemacht.

Im Pepton-Typhuswasser hatten sich die Bacillen ebenfalls äußerst reichlich vermehrt. Methode A fiel wiederum positiv aus.

Schlußfolgerung:

0,2 g käuflichen Chlorkalkes besitzen nicht so stark keimtötende Eigenschaften, daß sie imstande sind, sämtliche gewöhnlich oder gelegentlich im Wasser befindlichen Bakterien zu vernichten.

Eine Abnahme der Keime ist offenbar. Zur Erreichung absoluter Sterilität war demnach eine Steigerung der zuzusetzenden Chlorkalkmenge notwendig. Ich ging deshalb zu 0,3 g über, entsprechend 63 mg Chlor. An Reagentien kamen zur Verwendung:

Chlorkalk	0,3 g pro 1 l	
Salzsäure	12,0 gtt „ 1 l	
Natriumsulfit	0,6 g „ 1 l	(s. Tab. 15 p. 517).

Das Resultat war folgendes:

Die Wasserbakterien waren in keinem Falle sämtlich abgetötet. Desto erfreulicher war das Ergebnis bei den Choleraversuchen. Wie aus der Tabelle zu ersehen ist, waren von den 4 Versuchskolben 3 steril

Tabelle 15.

No.	Art des verwendeten Wassers	Keimzahl vor dem Versuche auf Gelatine pro ccm (Kontrollplatte)	Keimzahl nach vollendet. Sterilisierung, jedoch vor dem Peptonzusatz, pro ccm (Gießen je 2 ccm zur Platte)		Keimzahl der Peptonwasserlösung nach 8-tägigem Aufenthalte im Brütofen (Gießen je 2 ccm zur Platte)		Eintritt der Trübung im Peptonwasser im Brütofen am
			Gelatineplatte	Agarplatte	Gelatineplatte	Agarplatte	
1	Leitung	1 280	5	3	flüssig	3400	2. Tage
2	Lahn	3 102	2	0	512	4500	2. „
3	„	8 612	16	11	flüssig (fluorescierend)	unzählbar	2. „
4	Ketzerbach	26 912	13	35	1280	2110	2. „
5	„	23 111	1	0	823	1152	1. „
1	Cholerawass.	in Bouill. aufgeschwemmt. Kult. v. 1 Ag.-Röhrch. pro 1	0	0	0	0	keine Trübg.
2	„	do.	0	0	0	0	„ „
3	„	do.	0	0	0	0	„ „
4	„	do.	0	0	+	+	1. Tage
1	Typhuswass.	do.	0	0	+	+	3. „
2	„	do.	0	0	+	+	1. „
3	„	do.	0	0	0	0	keine Trübg.
4	„	do.	0	0	+	+	2. Tage
5	„	do.	0	0	+	+	2. „

0 = kein Wachstum, + = spärliches Wachstum, ++ = starkes Wachstum, +++ = sehr starkes Wachstum.

Zur Einwirkung gelangten 0,3 g Chlorkalk = 63 mg Chlor.

geworden, 1 nicht (Versuch 4); auch waren nur wenige Kolonieen auf den Platten vorhanden.

Von den 5 Typhuswässern wurde nur ein einziges (Versuch 3) keimfrei, während die anderen auf den Platten spärlich Typhuskeime zur Entwickelung brachten.

Es war mir nach diesen Versuchen klar, daß ich derjenigen Quantiät Chlorkalk, die absolute und sichere Sterilität innerhalb 10 Minuten in jedem Falle herbeizuführen imstande ist, sehr nahe war.

Ich griff deshalb zu der 3-fachen, von Bassenge und Lode angegebenen Quantität Chlorkalk, zu 0,45 g. Bezüglich des Salzsäurezusatzes blieb ich absichtlich bei gtt. 12 stehen, um eine Mitwirkung und Nebenwirkung der Säure, vor allem in den Versuchen mit Choleravibrionen vollständig auszuschließen. Bei einem Zusatz von 12 gtt. waren in den letzten Versuchen Cholerakeime gewachsen. Um die Einwirkung von Salzsäure auf die Vibrionen kennen zu lernen, setzte ich 1 l Cholerawasser 18 gtt. Salzsäure (also die eigentlich 0,45 g Chlorkalk entsprechende Menge) zu, darauf wiederum in der bekannten Weise die Peptonkochsalzlösung. Der Kolben blieb klar; es ließen sich durch unsere Kulturverfahren keine lebenden Vibrionen in dem Kolben mehr nachweisen. Zur Neutralisation verwandte ich allerdings wieder die doppelte Menge des Desinficiens, also in diesem Falle 0,9 g pro 1 l. Die baktericide Wirkung dieses Salzes auf die Vibrionen hatte ich ja nicht so zu fürchten wie die der Säure. An freiem Chlor kamen zur Einwirkung 106 mg pro 1 l.

Tabelle 16.

No.	Art des verwendeten Wassers	Keimzahl vor dem Versuche auf Gelatine pro ccm (Kontrollplatte)	Keimzahl nach vollendet. Sterilisierung, jedoch vor dem Peptonzusatz, pro ccm (Gießen je 2 ccm zur Platte)		Keimzahl der Peptonwasserlösung nach 8-tägigem Aufenthalte im Brütofen (Gießen je 2 ccm zur Platte)		Eintritt der Trübung im Peptonwasser im Brütofen
			Gelatineplatte	Agarplatte	Gelatineplatte	Agarplatte	
1	Leitung	35	0	1	3	7	keine Trübg.
2	Lahn	208	0	1	12	1	" "
3	"	316	0	1	1	1	" "
4	Ketzerbach	1600	1	0	0	0	" "
5	"	2112	0	24	18	53	" "
1	Cholerawass.	in Bouill. aufgeschwemmt. Kult. v. 1 Ag.-Röhrch. pro 1	0	0	0	0	" "
2	"	do.	0	0	0	0	" "
3	"	do.	0	0	0	0	" "
4	"	do.	0	0	0	0	" "
5	"	do.	0	0	0	0	" "
1	"	do.	0	0	0	0	" "
2	"	do.	0	0	0	0	" "
3	"	do.	0	0	0	0	" "
4	"	do.	0	0	0	0	" "
5	"	do.	0	0	0	0	" "

0 = kein Wachstum, + = spärliches Wachstum, ++ = starkes Wachstum, +++ = sehr starkes Wachstum.
Eingewirkt haben 0,45 g Chlorkalk = 106 mg Chlor.

Das Resultat war das erwartete. 0,45 g haben alle 1 l sterilen Wassers zugesetzten Choleravibrionen vernichtet; auch sämtliche Typhusbacillen waren abgetötet. Das Peptonwasser war vollständig klar geblieben, auf der Gelatine- und der Agarplatte war kein Wachstum eingetreten. Nur einzelne saprophytische Wasserbakterien waren selbst von der hohen Chlorkalkmenge unbeeinflußt geblieben. Da wohl in jedem Wasser einige sporenhaltige, äußerst widerstandsfähige Bakterien — um solche handelte es sich hier meist — enthalten sein werden, die selbst 1-stündigem Kochen gegenüber sich ziemlich gleichgiltig zeigen, so fallen diese, zumal es sich um unschädliche Mikroorganismen handelt, bei der Bewertung eines Desinfektionsmittels vollständig fort.

Die beiden letzten Versuchsreihen hatten sich mit Mengen von 0,3 und 0,45 g Chlorkalk beschäftigt.

Es mußte nun noch meine Aufgabe sein, festzustellen, ob 0,45 g wirklich die kleinste Quantität sei, die innerhalb 10 Minuten unsere Testobjekte unschädlich zu machen imstande ist. Zu diesem Behufe wurden noch zwei Reihen Versuche angeschlossen, die erste mit 0,35 und die zweite mit 0,4 g Chlorkalk.

Im ersten Falle kamen an Reagentien pro 1 l zur Verwendung:

Chlorkalk 0,35 g = 70 mg Cl.
Salzsäure 12,0 gtt.
Natriumsulfit 0,7 g (s. Tabelle 17 p. 519)

Das Resultat ist, wie aus der Tabelle ersichtlich, ein durchaus ungenügendes. Von je 5 Versuchen waren Typhusbacillen in jedem Falle, Choleravibrionen in 3 Fällen gewachsen.

Tabelle 17.

No.	Art des verwendeten Wassers	Keimzahl vor dem Versuche auf Gelatine pro ccm	Keimzahl nach vollendet. Sterilisierung, jedoch vor dem Peptonzusatz, pro ccm (Gießen je 2 ccm zur Platte)		Keimzahl der Peptonwasserlösung nach 8-tägigem Aufenthalte im Brütofen (Gießen je 2 ccm zur Platte)		Eintritt der Trübung im Peptonwasser im Brütofen
		(Kontrollplatte)	Gelatineplatte	Agarplatte	Gelatineplatte	Agarplatte	am
1	Leitung	112	0	1	2600	3016	2. Tage
2	Lahn	518	0	25	3400	8021	2. „
3	„	686	964	192	866	904	1. „
4	Ketzerbach	1010	0	0	1625	112	1. „
5	„	989	0	2	1950	3340	2. „
1	Cholerawass.	in Bouill. aufgeschwemmt. Kult. v. 1 Ag.-Röhrch. pro l	0	0	+++	+++	2. „
2	„	do.	0	0	0	0	keine Trübg.,
3	„	do.	0	0	++	++	1. Tage
4	„	do.	0	0	++	++	1. „
5	„	do.	0	0	0	0	keine Trübg.
1	Typhuswass.	do.	0	0	+++	+++	1. Tage
2	„	do.	+	+	+++	+++	1. „
3	„	do.	0	0	++	++	1. „
4	„	do.	0	0	+++	+++	1. „
5	„	do.	+	+	++	++	1. „

0 = kein Wachstum, + = spärliches Wachstum, ++ = starkes Wachstum, +++ = sehr starkes Wachstum.
Chlorkalkmenge 0,35 g = 70 mg Chlor.

Das Resultat ist demnach noch schlechter als dasjenige, welches mit 0,3 g Chlorkalk und 63 mg wirksamen Chlors in einem früheren Versuche erzielt werden konnte. Welche Faktoren hier mitgespielt haben, konnte ich nicht feststellen.

In der letzten Versuchsreihe kamen 0,4 g Chlorkalk mit einem Gehalte von 88 mg Chlor zur Einwirkung. Salzsäurezusatz betrug 12 gtt., Neutralisationsmenge 0,8 g (s. Tabelle 18 p. 520).

Die Typhuskeime waren sämtlich abgetötet, auch die Cholerakolben steril bis auf 2 (No. 2 und 3), in denen am 2. Tage nach der Desinfektion eine leichte Trübung sichtbar war. In der That ließen sich in beiden Versuchswässern Vibrionen nachweisen. Dieselben hatten sich demnach 1mal dem Chlor gegenüber widerstandsfähiger als die resistenten Erreger des Abdominaltyphus erwiesen, wenn nicht ein Versuchsfehler vorliegt.

Ich glaube damit den Nachweis erbracht zu haben, daß der Chlorkalk erst in einer Dosis von 0,45 g pro Liter, also der 3-fachen Lodeschen Menge, ungefähr dem 100-fachen der ursprünglich von Traube angegebenen Dosis, sicher imstande ist, innerhalb 10 Minuten die gelegentlich im Trinkwasser vorkommenden pathogenen Keime, die Choleravibrionen und die Typhusbacillen, in Einliterkolben abzutöten.

Es bliebe übrig, festzustellen, ob solche hohe Chlorkalkmengen, wie ich sie zur Sterilisation für notwendig halte, längere Zeit hindurch mit dem Wasser genossen, nicht schädigend auf den menschlichen Organismus, insbesondere den Intestinaltraktus, zu wirken imstande wären. Ich selbst habe einige Male ein mit 0,45 g Chlorkalk behandeltes Leitungswasser getrunken, kann jedoch nicht behaupten, daß es ein Ge-

Tabelle 18.

No.	Art des verwendeten Wassers	Keimzahl vor dem Versuche auf Gelatine pro ccm (Kontrollplatte)	Keimzahl nach vollendet. Sterilisierung, jedoch vor dem Peptonzusatz, pro ccm (Gießen je 2 ccm zur Platte)		Keimzahl der Peptonwasserlösung nach 8-tägigem Aufenthalte im Brütofen (Gießen je 2 ccm zur Platte)		Eintritt der Trübung im Peptonwasser im Brütofen am
			Gelatineplatte	Agarplatte	Gelatineplatte	Agarplatte	
1	Leitung	16	128	17	2010	325	1. Tage
2	Lahn	1 233	2	33	110	1950	1. „
3	„	514	2	256	1860	unzählbar	3. „
4	Ketzerbach	10 110	3	192	1304	2925	2. „
5	„	9 118	64	320	260	1820	2. „
1	Cholerawass.	in Bouill. aufgeschwemmt. Kult. v. 1 Ag.-Röhrch. pro l	0	0	0	0	keine Trübg.
2	„	do.	0	0	+	+	2. Tage
3	„	do.	0	0	+	+	2. „
4	„	do.	0	0	0	0	keine Trübg.
5	„	do.	0	0	0	0	„ „
1	Typhuswass.	do.	0	0	0	0	„ „
2	„	do.	0	0	0	0	„ „
3	„	do.	0	0	0	0	„ „
4	„	do.	0	0	0	0	„ „
5	„	do.	0	0	0	0	„ „

0 = kein Wachstum, + = spärliches Wachstum, ++ = starkes Wachstum, +++ = sehr starkes Wachstum.

Zugesetzte Chlorkalkmenge = 0,4 g entsprechend 88 mg Chlor.

nuß war. Ein derartiges Wasser schmeckt nicht nur widerlich, sondern sieht schon äußerlich infolge der Chlorkalktrübung ekelhaft und wenig zum Genuß anregend und unappetitlich aus. Außerdem würden die hohen Natriumsulfitmengen sicherlich für die Dauer nicht ohne Einfluß auf den Menschen sein.

Schon Bassenge (l. c.) erhob gegen das Neutralisationsmittel Traube's, das Natriumsulfit, den Einwand, daß ein damit behandeltes Wasser, wenn es längere Zeit hindurch getrunken würde, infolge der abführenden Wirkung des Natriumsulfats (Natriumsulfit wird zu Natriumsulfat oxydiert) Störungen im menschlichen Körper herbeiführen könne.

Die Reaktion verläuft dabei, wenn wir nur die Einwirkung des schwefligsaueren Natriums mit $Ca\langle{}^{Cl}_{OCl}$ betrachten, in folgender Weise:

$$Na_2SO_3 + Ca\langle{}^{Cl}_{OCl} = Na_2SO_4 + CaCl_2$$

es bilden sich also Natriumsulfat und Calciumchlorid.

Nicht selten enthält das käufliche Natriumsulfit in geringen Mengen noch Sulfat, so daß die eben geschilderte Wirkung des oxydierten Sulfites noch gesteigert wird.

Neben Natriumsulfat wird nach obiger Reaktionsformel auch noch das $CaCl_2$ gebildet. Es muß demnach durch den Zusatz von Chlorkalk, zumal in der hohen Dosis von 0,45 g pro 1 l, die Härte des Wassers um ein bedeutendes vermehrt werden, nach Lode um 2,37 deutsche Härtegrade bei Verwendung von 0,15 g Chlorkalk pro 1 l, was für unseren Fall einer Härtezunahme von 7,11 deutschen Härtegraden entsprechen würde. Ob eine derartige Erhöhung des Härtegrades immer,

z. B. bei an sich sehr harten Wässern, als gleichgiltig zu betrachten ist, darf füglich bezweifelt werden.

Deshalb ist meines Erachtens vor der Hand nicht nur von der Chlorkalksterilisation des Trinkwassers, sondern, da bisher alle als besonders wirksam bekannt gewesenen Mittel versagt haben, von jeder Desinfektion des Wassers mit Hilfe von Chemikalien — vielleicht Ozon ausgenommen — Abstand zu nehmen, bis ein anderes unschädliches Mittel gefunden ist, das in geringer, den Körper nicht nachteilig beeinflussender Quantität in kurzer Zeit — höchstens 10 Minuten — Wasser keimfrei zu machen imstande ist und in dieser Beziehung auch unseren heutigen Nachprüfungsmethoden standzuhalten vermag.

Weitere Studien über die Fällung des Caseïns durch Lab und Laktoserum.

[Aus dem hygienischen Institut der Universität Graz.]

II. Mitteilung.

Von Dr. **Paul Theodor Müller**, Assistenten am Institut.

I. Ueber Immunisierung mit Caseïnderivaten.

In einer früheren Arbeit (1) habe ich versucht, über die Wirkungsweise des Laktoserums einigen Aufschluß zu erlangen, wobei die Aehnlichkeiten und Unterschiede dieses Fällungsvorganges mit der Labkoagulation im Vordergrunde der Betrachtung standen. Ich konnte daselbst zeigen, daß zwar für die Labfällung wie für die Laktoserumwirkung die Anwesenheit von Kalksalzen erforderlich ist, daß jedoch ein wesentlicher Unterschied zwischen diesen beiden Vorgängen darin besteht, daß nur bei der Labkoagulation ein albumosenartiger Körper, das Molkeneiweiß, abgespalten wird; ferner ließ sich nachweisen, daß aus dem Laktoserumpräcipität das Caseïn vollkommen unverändert regeneriert werden kann, womit also ein weiterer grundlegender Unterschied der Labkoagulation gegenüber gegeben ist. Durch eine eingehende Diskussion dieser und einiger anderer Versuchsergebnisse suchte ich wahrscheinlich zu machen, daß der Laktoserumfällung überhaupt kein fermentativer Prozeß, sondern eine chemische Bindung zu Grunde liegt, welche zu einer Vereinigung des Präcipitins mit dem Caseïn führt, wobei das entstandene Reaktionsprodukt nur bei Anwesenheit von Ca- oder Ba-Salzen unlöslich ist. Ich legte mir nun weiterhin die Frage vor, ob es auch durch Einverleibung von Caseïnderivaten, von Produkten der tryptischen und peptischen Caseïnverdauung, ferner von Substitutionsprodukten dieses Eiweißkörpers gelänge, ein caseïnfällendes Serum zu erhalten. Diese Fragestellung war in mehrfacher Hinsicht von Interesse. Nach Ehrlich's Hypothese ist das wesentliche und ausschlaggebende Moment für die Entstehung von Antikörpern die Einführung von Substanzen mit gewissen „haptophoren“ Gruppen in den Organismus; von Gruppen, die zu gewissen Zellbestandteilen besondere Affinität besitzen und mit denselben eine, wie man annimmt, chemische Verbindung einzugehen vermögen. Wenn die Deutung, welche Dreyer und Madsen (2) ihren

Versuchen geben, zu Recht besteht, nach welchen Injektion von Diphtherietoxonen die Produktion von Antitoxin genau in derselben Weise auslöst, wie die Injektion des Toxins selbst, so scheint dabei der restierende Bestandteil der einverleibten Substanzen von ziemlich untergeordneter Bedeutung für die Bildung der Antikörper zu sein; in Ehrlich's Sprache ausgedrückt: es scheint, daß die Art der toxophoren und anderweitigen Gruppen des in den Organismus eingeführten chemischen Komplexes von weit geringerem Einfluß auf die Antikörperbildung ist, als die Art der haptophoren, und daß Aenderungen der ersteren, wie das eben citierte Beispiel lehrt, nicht notwendig auch eine Aenderung des erhaltenen Reaktionsproduktes, nämlich der gebildeten Antikörper, bedingen müssen. — Nun ist es ganz selbstverständlich, daß derartige, die Bildung von Antikörpern auslösende „haptophore Gruppen", soweit sie nicht etwa durch die fermentativen Spaltungen des betreffenden immunisierenden Körpers, in unserem Falle des Caseïns, zerstört werden, sich in den Spaltungsprodukten wiederfinden müssen, genau so, wie die Kohlehydratgruppe, der Tyrosinkomplex u. s. w. in den verschiedenen Bruchstücken des Eiweißmoleküls enthalten sind und nachgewiesen werden können. Es war daher berechtigt, sich die Frage vorzulegen, ob auch mit diesen Abbauprodukten des Caseïns ein Immunserum erzielt werden könne, welches Caseïn zu fällen imstande ist; ob also auch die mit den betreffenden haptophoren Gruppen behafteten Trümmer des Caseïnmoleküls noch eine ähnliche Reaktion im Organismus hervorzurufen vermögen, wie das ursprüngliche Caseïn. Allerdings mußte man sich bei Beginn dieser Versuche von vornherein klar sein, daß nur ein positives Ergebnis imstande sein konnte, obige Frage eindeutig zu entscheiden. Denn, fielen die Experimente negativ aus, mit anderen Worten, trat in dem Serum der mit den Verdauungsprodukten des Caseïns behandelten Tiere kein Laktopräcipitin auf, so konnte das eine doppelte Ursache haben: entweder waren die zur Erzeugung des letzteren unumgänglich notwendigen haptophoren Gruppen durch die fermentative Spaltung zerstört oder dieselben waren zwar erhalten, vermochten aber infolge der veränderten Beschaffenheit des Komplexes, dem sie angehören, nicht mehr in der gleichen Weise auf die Zellen einzuwirken wie früher, da sie noch einen Teil des Caseïnmoleküls bildeten. Immerhin bot aber auch ein eventuelles negatives Versuchsergebnis genügendes theoretisches Interesse, um die Ausführung derartiger Experimente zu rechtfertigen.

Ein weiterer Gesichtspunkt, von welchem aus derartige Versuche wünschenswert erscheinen mußten, war der folgende. Bekanntlich nehmen sowohl Fleisch- wie Pflanzenfresser täglich beträchtliche Eiweißmengen mit der Nahrung auf, ohne daß ihr Serum die Eigenschaft gewinnt, mit diesen Eiweißkörpern zusammengebracht, spezifische Niederschläge zu erzeugen[1]), während die subkutane oder intraperitoneale Einverleibung weit geringerer Quantitäten derselben Substanzen binnen relativ kurzer Zeit von Präcipitinbildung gefolgt ist. Es liegt nun gewiß sehr nahe, diese Thatsache durch die Veränderungen zu erklären, welche die Eiweißkörper bei der peptischen und tryptischen Verdauung erleiden, und also anzunehmen, daß dieselben in ähnlicher Weise hierbei durch die Verdauungssekrete unwirksam gemacht, „entgiftet" werden,

1) Vergl. Hamburger, Wien. klin. Wochenschr. 1901. No. 49.

wie manche bakterielle und tierische Giftstoffe (z. B. Schlangengift), die ja auch bei der Einführung in den Magen weder Immunität noch Antitoxinproduktion hervorrufen. Auch hierüber war von der eingangs erwähnten Versuchsanordnung einiger Aufschluß zu erwarten.

Endlich versprachen diese Versuche, einen Beitrag zu einer Frage zu liefern, welche erst in der allerneuesten Zeit, unter dem Einfluß einer immer planmäßiger durchgeführten Anwendung eiweiß-chemischer Methoden auf das Studium des Immunisierungsvorganges und der dabei entstehenden Produkte, aufgeworfen werden konnte. Bis vor kurzem nahm man nämlich allgemein an, daß die immunisierenden Substanzen, seien sie nun pflanzlicher oder tierischer Natur, sämtlich den Eiweißkörpern zuzurechnen seien. Die schönen Untersuchungen Jakoby's (3) haben zuerst die Unrichtigkeit dieser Ansicht, wenigstens in ihrer allgemeinen Fassung, dargethan, und für den speziellen Fall des Ricins gezeigt, daß das wirksame giftige Agens nicht ein „Toxalbumin“, sondern ein den Eiweißsubstanzen fernestehender Körper ist, der sich von den letzteren vollkommen trennen läßt und in gereinigtem Zustande die gewöhnlichen Eiweißreaktionen nicht mehr giebt.

Analog haben vor kurzem Obermayer und Pick (4) gefunden, daß die immunisierende Substanz des Eierklars, das „Präcipitinogen“, kein Eiweißkörper ist, sondern eine diesen letzteren anhaftende Beimengung anderer Natur, welche auch durch energische Trypsinverdauung bis zum Verschwinden der empfindlichsten Eiweißreaktionen nicht angegriffen wird und rasches Auftreten von Immunprodukten hervorzurufen vermag[1]). Dagegen erlischt das Immunisierungsvermögen bei der Spaltung durch Pepsinsalzsäure. Man durfte sich daher mit Recht die Frage vorlegen, wie sich denn beim Laktoserum diese Verhältnisse gestalten, und ob auch hier eine trypsinfeste Beimengung des Caseïns, oder aber, wie wir bisher stillschweigend voraussetzten, das Caseïn selbst für die Entstehung des Laktopräcipitins verantwortlich zu machen sei.

Allerdings muß ich gestehen, daß mir die erstere der beiden genannten Eventualitäten, trotz den Befunden von Jakoby, Obermayer und Pick, von vornherein wenig Wahrscheinlichkeit zu besitzen schien, und zwar aus folgendem Grunde: Setzt man nämlich zu einer Eiweißlösung das entsprechende, durch Immunisierung mit derselben erhaltene Serum hinzu, so hat der entstehende Niederschlag in den meisten Fällen — zu welchen auch die von Jakoby, Pick und Obermayer untersuchten gehören — durchaus nichts Charakteristisches an sich; es ist ein Niederschlag, welchem es unmöglich anzusehen ist, was für Bestandteile des Serums bezw. der Eiweißlösung an seiner Bildung beteiligt sind. Anders bei dem uns speziell interessierenden Laktoserum. Hier lehrt schon der erste Blick, daß es sich um eine Fällung des Caseïns handelt, und ich konnte in meiner früheren Arbeit in der That den Nachweis führen, daß man aus dem gut ausgewaschenen Laktopräcipitat das Caseïn mit allen seinen Eigenschaften wiedergewinnen kann. Nun ist es nach allem, was wir über das Zustandekommen der Immunkörper im tierischen Organismus wissen, zweifellos, daß diejenigen Bestandteile der zur Injektion verwendeten Flüssigkeiten, welche mit den entstehenden Immunseris spezifisch reagieren, auch

1) Aehnliche Befunde haben in jüngster Zeit Hausmann für die agglutinierenden und präcipitablen Substanzen des Abrins und Landsteiner und Calvo für die präcipitinbildenden Stoffe des Pferdeserums erhoben.

die Bildung der betreffenden Immunkörper verursacht haben, mit anderen Worten, daß die immunisierenden Substanzen es sind, welche mit den auf ihre Reizwirkung hin produzierten Antikörpern in chemische Wechselwirkung treten, ein allgemeiner Satz, von dem auch die trypsinfeste immunisierende Substanz des Eiklars keine Ausnahme machen dürfte[1]. Wenden wir dieses Prinzip auf den Fall des Laktoserums an, so ergiebt sich daraus, daß man mit aller Wahrscheinlichkeit das Caseïn und nicht irgend eine anderweitige Beimengung desselben für die Entstehung des Laktopräcipitins wird verantwortlich machen dürfen, da ja, wie gesagt, das Caseïn nachweislich mit dem letzteren zu einer, bei Gegenwart von Kalksalzen unlöslichen, Verbindung zusammentritt, aus welcher es anscheinend unverändert wieder regeneriert werden kann. Anderenfalls müßte man die gewiß ziemlich unplausible Annahme machen, daß eine von dem Caseïn vollkommen verschiedene Substanz imstande sei, bei ihrer Einverleibung in den Organismus die Bildung von Immunkörpern anzuregen, welche in ihren Affinitäten speziell auf das Caseïn abgestimmt wären. War diese Erwägung richtig, dann mußte die immunisierende Eigenschaft der Milch bezw. des Caseïns bei länger dauernder Trypsinverdauung unbedingt geschädigt werden und jedenfalls erloschen sein, bevor die Spaltung bis zum Verschwinden der Eiweißreaktionen gediehen war; denn es war wohl als sicherstehend anzunehmen, daß die betreffenden haptophoren Gruppen des Caseïns eine derartig weitgehende Spaltung nicht überstehen würden.

Meine Versuche, an deren Mitteilung ich nunmehr gehe, wurden mit folgenden Caseïnderivaten angestellt:

1) Primäre Albumosen (Pepsinverdauung).
2) Sekundäre Albumosen (Pepsinverdauung).
3) Gemisch sämtlicher löslicher Produkte der Pepsinverdauung (Filtrat vom ausgeschiedenen Paranucleïn).
4) Pankreasverdauung (Gemisch sämtlicher Spaltungsprodukte).
5) Ca-freies Paracaseïn (durch Einwirkung von Lab auf Ca-freies Caseïn erhalten; das gleichzeitig entstandene Molkeneiweiß wurde nicht entfernt).
6) Jodcaseïn [dargestellt nach Liebrecht (5)].

Ich lasse zunächst die ausführlichen Versuchsprotokolle folgen.

I. Primäre Albumosen (Pepsinverdauung).

Versuch I.

Frisch gefälltes Säurecaseïn wurde mit 0,4-proz. Salzsäure, in welcher eine entsprechende Menge wirksamen Pepsins gelöst war, verrieben, und, unter Toluol, 12h im Brutschrank bei 37° digeriert. Das neutralisierte Filtrat wurde auf etwa 1/3 des ursprünglichen Volumens eingeengt, wenn nötig, nochmals filtriert und mit dem gleichen Volumen gesättigter Ammonsulfatlösung versetzt, wodurch die primären Albumosen abgeschieden wurden (Fraktion I). Das Filtrat von Fraktion I wurde dann durch Eintragen von Ammonsulfat in Substanz gesättigt, wobei der größte Teil der sekundären Albumosen niedergeschlagen wurde (Fraktion II). Beide Fraktionen wurden zwischen

1) Allerdings hat Pick bei dem aus Typhuskulturen isolierten, in vitro gegenüber Immunserum sehr wirksamen Bakterienkoagulin K keine immunisierende Wirkung feststellen können, so daß sich also diese beiden Eigenschaften (nämlich die Fähigkeit, im Organismus Immunkörper zu erzeugen, und jene, das Phänomen der Koagulation in vitro hervorzurufen) in dem genannten Falle nicht miteinander zu decken scheinen. Weitere Untersuchungen über dieses merkwürdige Verhalten hat Pick in Aussicht gestellt.

Filtrierpapier abgepreßt, in dest. Wasser gelöst, durch nochmalige Fällung gereinigt, bei 100° getrocknet und zu 5 Proz. in dest. Wasser gelöst, in welcher Form sie zu den Injektionen verwendet wurden.

Kaninchen 1. Fraktion I.

Das Tier erhielt vom 14. März bis 2. Mai 19 Injektionen zu je 12 ccm, also im ganzen 228 ccm, oder 11,4 g der primären Albumosen. 3 Tage nach der letzten Injektion wird das Tier durch Verbluten aus der Carotis getötet.

2 ccm Serum 1 + 1,0 Milch + 1 $CaCl_2$
2 „ „ 1 + 0,5 „ + 1 $CaCl_2$ } 0 (auch nach 4h)
2 „ „ 1 + 0,2 „ + 1 $CaCl_2$

2 ccm Serum 1 + 1,0 ccm 5,0-proz. Lösung von Fraktion I
2 „ „ 1 + 1,0 „ 0,5 „ „ „ „ I } 0
2 „ „ 1 + 1,0 „ 0,05 „ „ „ „ I
2 „ „ 1 + 0,5 „ 0,05 „ „ „ „ I

Versuch II.

Kaninchen 11. Fraktion I.

Das Tier erhält vom 14. März bis 4. Mai 20 Injektionen zu je 10 ccm, also im ganzen 200 ccm, oder 10 g der primären Albumosen. 7. Mai Blutentnahme.

1 ccm Serum 11 + 0,2 Milch: 0
1 „ „ 11 + 0,2 „ + 0,5 $CaCl_2$: ? Keine deutliche Abscheidung des Caseïns, aber die Flüssigkeit nicht vollkommen homogen; nach Centrifugieren kein Bodensatz: 0
2 „ „ 11 + 0,3 „ + 1,0 $CaCl_2$ } 0
1 „ H_2O + 0,2 „ + 1,0 $CaCl_2$

1 ccm Serum 11 + 0,5 ccm einer 5,0-proz. Lösung von Fraktion I
1 „ „ 11 + 0,5 „ „ 0,5 „ „ „ „ I } 0
1 „ „ 11 + 0,5 „ „ 0,05 „ „ „ „ I

II. Sekundäre Albumosen.

Versuch III.

Kaninchen 32. Fraktion II.

Das Tier erhielt vom 14. März bis 4. Mai 15 Injektionen zu je 10 ccm von Fraktion II, also zusammen 150 ccm oder 7,5 g der sekundären Albumosen. 7. Mai Blutentnahme.

1 ccm Serum 32 + 0,2 Milch
1 „ „ 32 + 0,2 „ + 0,5 ccm $CaCl_2$ } 0
2 „ „ 32 + 0,3 „ + 1,0 „ $CaCl_2$

1 ccm Serum 32 + 0,5 ccm einer 5,0-proz. Lösung von Fraktion II
1 „ „ 32 + 0,5 „ „ 0,5 „ „ „ „ II } 0
1 „ „ 32 + 0,5 „ „ 0,05 „ „ „ „ II

Versuch IV.

Kaninchen 8 erhielt vom 24. März bis 9. Mai 15 Injektionen zu je 10 ccm von Fraktion II, also zusammen 7,5 g der sekundären Albumosen. 12. Mai Blutentnahme.

1 ccm Serum 8 + 0,3 Milch + 1 ccm $CaCl_2$ } 0
2 „ „ 8 + 0,3 „ + 1 „ $CaCl_2$

1 ccm Serum 8 + 0,5 ccm einer 5,0-proz. Lösung von Fraktion II
1 „ „ 8 + 0,5 „ „ 0,5 „ „ „ „ II } 0
1 „ „ 8 + 0,5 „ „ 0,05 „ „ „ „ II

III. Pepsinverdauung.

Versuch V.

Caseïn wurde 3 Tage mit Pepsinsalzsäure im Brutschrank digeriert, filtriert, das Filtrat neutralisiert und auf $^1/_3$ Volumen eingeengt.

Kaninchen 29 erhielt vom 22. Mai bis 8. Juni 8 Injektionen zu je 15 ccm. Blutentnahme 11. Juni.

a) 1 ccm Serum 29 + 0,2 ccm Milch
1 „ „ 29 + 0,2 „ „ + 0,5 ccm $CaCl_2$ } 0
1 „ „ 29 + 0,5 „ „ + 1,0 „ $CaCl_2$

b) 1 ccm Serum 29 + 0,5 ccm Pepsinverd. geringe Trübung (?)
1 „ „ 29 + 0,05 „ „ + 0,5 ccm H_2O } 0
1 „ „ 29 + 0,01 „ „ + 0,5 „ H_2O

IV. Pankreasverdauung.

Eine 5-proz. Caseïnlösung wurde mit NaOH schwach alkalisch gemacht und mit einem wirksamen Pankreatinpräparat (Merck) versetzt. Nachdem dieselbe 3 Tage unter Toluol im Brutschrank bei 37° digeriert worden war, wurde dieselbe stark angesäuert, um etwa noch vorhandenes, nicht angegriffenes Caseïn zur Abscheidung zu bringen — eine Vorsichtsmaßregel, die sich übrigens als überflüssig erwies — dann neutralisiert, auf dem Wasserbade auf ungefähr die Hälfte ihres Volumens eingeengt und von der geringen entstandenen Trübung abfiltriert. Diese, das Gemisch sämtlicher in Lösung gebliebener Produkte der tryptischen Caseïnverdauung enthaltende Flüssigkeit wurde direkt, ohne weitere Veränderung, zu den Injektionen benutzt.

Versuch VI.

Kaninchen 20 erhielt vom 5. Mai bis 21. Mai 7 Injektionen zu je 15 ccm obiger Lösung, im ganzen also 105 ccm, intraperitoneal. Blutentnahme 3 Tage nach der letzten Injektion.

1 ccm Serum 20 + 0,3 ccm Milch } 0
1 „ „ 20 + 0,3 „ „ + 0,5 ccm $CaCl_2$ } 0
2 „ „ 20 + 0,3 „ „ } 0
2 „ „ 20 + 0,3 „ „ + 0,5 „ $CaCl_2$ } 0
2 „ H_2O 20 + 0,3 „ „ + 0,5 „ $CaCl_2$ } 0

1 ccm Serum 20 + 0,5 ccm Pankreasverd.: } 0
1 „ „ 20 + 0,1 „ „ + 0,4 ccm H_2O } 0
1 „ „ 20 + 0,05 „ „ + 0.5 „ H_2O } 0

Versuch VII.

Kaninchen 15 erhielt vom 10. Mai bis 30. Mai 9 Injektionen zu je 15 ccm Pankreasverdauung. Am 30. Mai eine 10. Injektion. Da das Tier nach derselben schwer krank erscheint, wird dasselbe 3h nach der Injektion verblutet.

1 ccm Serum 15 + 0,3 ccm Milch + 0,5 ccm $CaCl_2$ } 0
2 „ „ 15 + 0,3 „ „ + 0,5 „ $CaCl_2$ } 0

1 ccm Serum 15 + 0,5 ccm Pankreasverd. } 0
1 „ „ 15 + 0,1 „ „ + 0,4 ccm H_2O } 0
1 „ „ 15 + 0,05 „ „ + 0,5 „ H_2O } 0

Versuch VIII.

Kaninchen 6 erhielt vom 25. Mai bis 12. Juni 10 Injektionen zu je 15 ccm Pankreasverdauung. 16. Mai Blutentnahme.

1 ccm Serum 6 + 0,3 ccm Milch + 0,5 ccm $CaCl_2$ } 0
2 „ „ 6 + 0,3 „ „ + 0,5 „ $CaCl_2$ } 0

1 ccm Serum 6 + 0,5 ccm Pankreasverd. } 0
1 „ „ 6 + 0,1 „ „ + 0,4 ccm H_2O } 0

Versuch IX.

Kaninchen 21 erhielt 12 Injektionen zu je 15 ccm Pankreasverdauung; 3 Tage nach der letzten Injektion Blutentnahme.

1 ccm Serum 21 + 0,3 ccm Milch + 0,5 ccm $CaCl_2$ } 0
2 „ „ 21 + 0,3 „ „ + 0,5 „ $CaCl_2$ } 0

1 ccm Serum 21 + 0,5 ccm Pankreasverd. } 0
1 „ „ 21 + 0,05 „ „ + 0,4 ccm H_2O } 0
1 „ „ 21 + 0,01 „ „ + 0,5 „ H_2O } 0

V. Paracaseïn.

Die Paracaseïnlösung wurde folgendermaßen hergestellt. Frische Milch wurde auf das 3-fache Volumen mit Wasser verdünnt, mit Essigsäure gefällt und die Fällung durch Centrifugieren von der Flüssigkeit getrennt. Durch Zusatz ammoniakalischen Wassers wurde dann der Niederschlag bei neutraler Reaktion in Lösung gebracht und auf das ursprüngliche Volumen der Milch aufgefüllt. Endlich wurde etwas Labessenz hinzugefügt, einige Zeit auf 40° erwärmt und dann stets, zur Zerstörung des Fermentes, aufgekocht.

Versuch X.

Kaninchen 18 erhielt innerhalb 14 Tagen 5 Injektionen zu je 10 ccm Paracaseïn. Blutentnahme 5 Tage nach der letzten Injektion.

1 ccm Serum 18 + 0,2 ccm Milch } Fällung
1 „ „ 18 + 0,5 „ „ }
1 „ H_2O + 0,5 „ „ + 0,5 ccm $CaCl_2$ 0

Versuch XI.

Kaninchen 9 erhielt vom 27. März bis 12. April 5 Injektionen zu je 10 ccm Paracaseïn. 15. April Blutentnahme.

1 ccm Serum 9 + 0,3 ccm Milch } Fällung
1 „ „ 9 + 0,5 „ „ }
1 „ H_2O + 0,5 „ „ + 0,5 ccm $CaCl_2$ 0

Versuch XII.

Kaninchen 16 erhielt vom 11. April bis 25. April 6 Injektionen zu je 8 ccm Paracaseïn. Blutentnahme 29. April.

1 ccm Serum 16 + 0,3 ccm Milch } Fällung
1 „ „ 16 + 0,5 „ „ }

VI. Jodcaseïn.

Dasselbe wurde in Anlehnung an die Vorschrift von Liebrecht in folgender Weise bereitet: Reines Caseïn (von Bender und Hobein in München bezogen) wurde mit Jod (etwa im Verhältnis 8 : 2) verrieben und mit Wasser 1^h auf dem Wasserbade gekocht. Das entstandene braune Pulver wurde mehrmals mit destilliertem Wasser ausgewaschen, dann in ammoniakalischem Wasser zu neutraler Reaktion gelöst und durch Zusatz einer starken Lösung von Natriumthiosulfat (bis zur Entfärbung) von dem überschüssigen sowie von dem leicht abspaltbaren Jod des Perjodcaseïns befreit, wodurch aus dem letzteren das eigentliche Jodcaseïn hervorgeht, welches nach Liebrecht nur fest gebundenes Jod enthält. Zur Entfernung des Thiosulfats wurde das Jodcaseïn dann durch verdünnte Essigsäure gefällt, gewaschen und in alkalischem Wasser gelöst.

Versuch XIII.

Kaninchen 5 erhielt vom 20. April bis 2. Mai 5 Injektionen zu je 8 ccm Jodcaseïn. Blutentnahme 6. Mai.

1,0 ccm Serum 5 + 0,2 ccm Milch + 0,2 ccm $CaCl_2$ } momentane Fällung
0,5 „ „ 5 + 0,2 „ „ + 0,2 „ $CaCl_2$ }
1,0 „ H_2O + 0,2 „ „ + 0,2 „ $CaCl_2$ 0

Versuch XIV.

Kaninchen 16 erhielt innerhalb 14 Tagen 5 Injektionen zu je 8 ccm Jodcaseïn. Blutentnahme 5 Tage nach der letzten Injektion.

1 ccm Serum 16 + 0,2 ccm Milch + 0,5 ccm $CaCl_2$ } Fällung
1 „ „ 16 + 0,5 „ „ + 0,5 „ $CaCl_2$ }
1 „ H_2O + 0,5 „ „ + 0,5 „ $CaCl_2$ 0

Versuch XV.

Kaninchen 26 erhielt innerhalb 14 Tagen 5 Injektionen zu je 10 ccm Jodcaseïn. Blutentnahme 4 Tage nach der letzten Injektion.

1 ccm Serum 26 + 0,3 ccm Milch Fällung
1 „ H_2N + 0,5 „ „ + 0,5 ccm $CaCl_2$ 0

Ueberblicken wir nun die Gesamtheit unserer Versuche und fassen wir deren Ergebnisse kurz zusammen, so müssen wir sagen, daß es weder mit den Produkten der peptischen noch der — selbst nur kurze Zeit andauernden — tryptischen Caseïnverdauung gelungen ist, ein caseïnfällendes, also präcipitinhaltiges Immunserum zu erzielen (Versuch I—IX). Wie aus den in der Einleitung gemachten Bemerkungen zu entnehmen ist,

läßt sich aus dieser Thatsache nicht ohne weiteres auf eine Zerstörung der betreffenden haptophoren Gruppe des Caseïns schließen, wenn mir diese Erklärung auch die weitaus wahrscheinlichste dünkt. Soviel aber geht mit Sicherheit aus diesen Versuchen hervor, daß die immunisierende Substanz der Milch resp. der Caseïnlösungen nicht, wie in dem Falle des Ricins und des Eiklars, eine der tryptischen Spaltung widerstehende, von den Eiweißkörpern zu trennende Substanz sein kann, sondern aller Wahrscheinlichkeit nach mit dem Caseïn identisch ist, wofür ja auch die eingangs angeführten Gründe sehr entschieden zu sprechen scheinen.

Ein sehr bemerkenswerter Nebenbefund bei diesen Versuchen war die Thatsache, daß die erhaltenen Sera nicht nur nicht imstande sind, Caseïn zu fällen, sondern auch mit den betreffenden Abbauprodukten des Caseïns keine Präcipitate geben, obwohl bei einzelnen dieser Experimente die Immunisierung durch 2 Monate hindurch fortgesetzt worden war. Ganz analog haben Obermayer und Pick in ihrer bereits mehrfach citierten Mitteilung gefunden, daß dem Pepton Witte, welches die peptischen Spaltungsprodukte des Fibrins enthält, keine oder nur zweifelhafte immunisierende Fähigkeit zukommt. Allerdings muß man sich vor Augen halten, daß aus den geschilderten Versuchen nur auf das Ausbleiben einer Präcipitinbildung geschlossen werden kann, daß es aber ganz gut denkbar wäre, daß durch die Behandlung mit diesen Spaltungsprodukten Antikörper entstehen, welche zwar keine fällende Eigenschaft besitzen, aber doch, nach Art der Antitoxine, auf die betreffenden Eiweißderivate einwirken und sich mit denselben verbinden könnten. Ob diese Vermutung zutreffend ist oder nicht, werden weitere Untersuchungen lehren müssen.

Im Gegensatze zu diesen negativ ausgefallenen Immunisierungsversuchen gelang es leicht, mit kalkfreiem Labparacaseïn und mit (nach der Vorschrift von Liebrecht) jodiertem Caseïn Präcipitinbildung auszulösen. Die so erzielten Immunsera riefen, mit Milch zusammengebracht, eine ganz ähnliche Fällung des Caseïns hervor, wie echtes Laktoserum (Versuch X bis XV). Natürlich folgt hieraus noch nicht, daß diese verschiedenen Laktopräcipitine auch untereinander identisch sind, da ja durch die Einwirkung des Labfermentes bezw. durch die Jodierung haptophore Gruppen zerstört und neue aufgeschlossen worden sein konnten, welche Verschiedenheiten der auf sie abgestimmten Antikörper bedingen mußten.

Derartige geringfügige Differenzen nachzuweisen, ist natürlich im allgemeinen keine leichte Aufgabe und wird nur in ganz speziellen Fällen, unter besonders günstigen Umständen, gelingen. Gerade bei dem Paracaseïnserum war jedoch die Aussicht vorhanden, derartige Unterschiede, falls dieselben in der That bestehen sollten, aufdecken zu können, und zwar auf Grund der folgenden Erwägungen. Wie ich in meiner ersten Arbeit zeigen konnte, verliert das Caseïn durch die Einwirkung des Labfermentes seine Fähigkeit, das Laktopräcipitin zu binden und, bei seiner Fällung durch verdünnte Essigsäure, in den entstehenden Niederschlag mitzunehmen. Andererseits war nach allem, was wir über die Entstehung der Antikörper wissen, zu erwarten, daß die durch die Behandlung mit Paracaseïn erzeugten Präcipitine durch eine starke Affinität zu diesem letzteren ausgezeichnet sein würden.

Dann müßte es aber, im Gegensatze zu dem Verhalten des Laktopräcipitins, hier gelingen, durch Zusatz von Paracaseïn und nachträglicher Entfernung desselben mit Hilfe von verdünnter Essigsäure, auch das Präcipitin vollkommen aus dem Serum zum Verschwinden zu bringen. Der Entscheidung dieser Frage sind die Versuche XVI—XIX gewidmet. Als Kontrolle dienten Parallelversuche mit Laktoserum einerseits und mit unverändertem Caseïn andererseits. Bemerkt sei noch, daß die Paracaseïntiere ebenso oft und ebenso große Paracaseïnmengen injiziert erhielten, als die Kontrolltiere Caseïn resp. Milch.

Bevor wir jedoch zur Diskussion der Ergebnisse dieser Versuchsreihen schreiten, müssen wir noch auf einen Umstand näher eingehen, welcher für das Gelingen derartiger Experimente von großer Bedeutung ist. So leicht man nämlich den Verlust an präcipitinbindender Fähigkeit nachzuweisen vermag, welchen das Caseïn bei der Labspaltung erleidet, so muß doch andererseits hervorgehoben werden, daß dieser Verlust kein absoluter ist. Steigert man nämlich die Paracaseïnmenge, die man zu dem Laktoserum bei diesen Versuchen hinzusetzt, auf das 3—4fache, so kann man wieder eine vollständige Bindung des Laktopräcipitins beobachten. Ob diese wirklich dem Paracaseïn als solchem zuzuschreiben oder etwa auf Caseïnreste zu beziehen ist, welche der Labwirkung entgangen sind, diese Frage möchte ich mit Rücksicht auf die technische Schwierigkeit, das kalkfreie Paracaseïn von dem Caseïn zu trennen, unentschieden lassen. Die Unsicherheit, die sich aus diesem Verhalten des Paracaseïns für unsere Versuche ergeben würde, läßt sich nun in sehr einfacher Weise dadurch vollständig beseitigen, daß man einen Ueberschuß desselben strengstens vermeidet und niemals mehr Paracaseïn zu dem betreffenden Serum hinzufügt, als der Caseïnmenge entspricht, welche dasselbe gerade eben noch zu fällen vermag. Eine Bestimmung der caseïnfällenden Kraft des betreffenden Serums muß also diesen Versuchen unbedingt vorangeschickt werden.

Hält man sich an diese Vorschrift, so ergeben sich die untenstehenden Resultate, welche sich in folgender Weise schematisch darstellen lassen (Versuch XVI—XIX):

I. Laktoserum[1]):
   a) Caseïn: Bindung des Präcipitins,
   b) Paracaseïn: **Keine Bindung des Präcipitins.**

II. Paracaseïnserum:
   a) Caseïn: Bindung des Präcipitins,
   b) Paracaseïn: **Bindung des Präcipitins.**

Das heißt also, in Worten ausgedrückt: Während das Caseïn imstande ist, die Präcipitine beider Serumarten zu binden, vermag das Paracaseïn unter denselben Bedingungen nur das Präzipitin des Paracaseïnserums zu verankern, nicht aber das Präzipitin des Laktoserums. Dar-

1) Fuld hat in einer Arbeit (Hofmeister's Zeitschr. Bd. II. Heft 7—9) mitgeteilt, daß er bei einem Kaninchen, das mit gekochter Milch behandelt worden war, keine Präcipitinbildung nachweisen konnte. Demgegenüber möchte ich bemerken, daß bei den meisten meiner Versuche, über die in der vorliegenden wie in meiner ersten Mitteilung berichtet wurde, stets gekochte Milch zur Injektion diente, und daß ich niemals negative Resultate bezüglich Präcipitinbildung zu verzeichnen hatte. Worin diese Differenz der Befunde ihren Grund hat, vermag ich nicht anzugeben.

aus geht aber hervor, **daß die beiden Präcipitine nicht miteinander identisch sein können**, wenn sie auch, wie ihre Verwandtschaft zu dem Caseïn beweist, gewisse „haptophore Gruppen“ miteinander gemeinsam haben dürften. Es entspricht somit nach diesen Experimenten der bereits in meiner ersten Arbeit aufgedeckten Verschiedenheit der „haptophoren Gruppen“ des Caseïns und Paracaseïns auch eine Verschiedenheit der mit diesen Eiweißkörpern erzielten Immunsera. Wie es zu erklären ist, daß hierbei die Präcipitine des Paracaseïnserums sowohl durch Caseïn als durch Paracaseïn gebunden werden, während die des Laktoserums unter gleichen Versuchsbedingungen nur zu dem Caseïn Affinitäten besitzen, darüber vermag ich nichts Sicheres anzugeben; zwar lassen sich unschwer Anordnungen der betreffenden haptophoren Gruppen erdenken, welche dieser Bedingung Genüge leisten würden; da es sich jedoch hierbei nur um die Aufstellung von für einen speziellen Fall zugeschnittenen Hypothesen handeln würde, welchen kaum mehr Bedeutung als einer geistreichen Spielerei zugeschrieben werden könnte, so glaube ich füglich von einer derartigen Betrachtung absehen zu sollen.

Versuch XVI.

Kaninchen 31 erhielt innerhalb 14 Tagen 5 Injektionen zu je 10 ccm Paracaseïn von der Konzentration der Milch. Blutentnahme 2 Tage nach der letzten Injektion.

a) 1 ccm Serum 31 + 0,3 ccm Milch Fällung
1 „ „ 31 + 0,5 „ „ „
1 „ „ 31 + 0,7 „ „ 0

b) 2 ccm Serum 31 + 1,0 ccm Paracaseïn	+ 8 Tr. Essigsäure centrifugiert;	neutralisiert + 0,3 ccm Milch + 0,5 ccm $CaCl_2$	0
2 „ „ 31 + 1,0 „ Milch			0
2 „ H_2O + 1,0 „ Paracaseïn			0
2 „ Serum 31 + 0,5 „ „	+ 8 Tr. Essigsäure centrifugiert;	neutralisiert + 0,3 ccm Milch + 0,5 ccm $CaCl_2$	0
2 „ „ 31 + 0,5 „ Milch			0
2 „ H_2O + 0,5 „ Paracaseïn			0

Kontrollen.

c) 2 ccm Serum 31 + 2 ccm H_2O + 0,3 ccm Milch + 0,5 ccm $CaCl_2$ Fällung
d) Laktoserum 32.
1 ccm Serum 32 + 0,5 ccm Milch Fällung
1 „ „ 32 + 0,7 „ „ „
1 „ „ 32 + 1,0 „ „ „
1 „ „ 32 + 1,2 „ „ 0

e) 2 ccm Serum 32 + 1,0 ccm H_2O + 2,0 ccm Caseïn	+ 8 Tr. Essigs. centrif., neutralis. + 0,3 Milch + 0,5 $CaCl_2$	0
2 „ „ 32 + 1,0 „ „ + 2,0 „ Paracas.		**Fällg.**
2 „ H_2O + 1,0 „ „ + 2,0 „ „		0
f) 0,5 ccm Ser. 32 + 2,0 „ „ + 0,5 „ Caseïn	+ 8 Tr. Essigsäure centrif., neutralis. + 0,3 ccm Milch	0
0,5 „ „ 32 + 2,0 „ „ + 0,5 „ Paracas.		**Fällg.**
2,2 „ H_2O + 0,5 „ „		0

Versuch XVII.

Kaninchen 26 erhielt innerhalb 14 Tagen 5 Injektionen zu je 10 ccm Paracaseïn von der Konzentration der Milch. Blutentnahme 5 Tage nach der letzten Injektion.

a) 1 ccm Serum 26 + 0,3 ccm Milch Fällung
1 „ „ 26 + 0,5 „ „ „
1 „ „ 26 + 0,7 „ „ 0

b) 2 ccm Serum 26 + 1,0 ccm Paracaseïn	+ 10 Tr. Essigsäure; centrifugiert, neutralisiert + 0,3 Milch + 0,5 $CaCl_2$	0
2 „ „ 26 + 1,0 „ Milch		0
2 „ H_2O + 1,0 „ Paracaseïn		0
2 „ Serum 26 + 2,0 „ „	+ 10 Tr. Essigsäure; centrifugiert, neutralisiert + 0,3 Milch + 0,5 $CaCl_2$	0
2 „ „ 26 + 2,0 „ Milch		0
2 „ H_2O + 2,0 „ Paracaseïn		0

Kontrollen.

c) 2 ccm Serum 26 + 2,0 ccm H_2O + 0,3 ccm Milch Fällung
d) Laktoserum 24 (5 Injektionen Milch).
1 ccm Serum 24 + 0,3 ccm Milch Fällung
1 „ „ 24 + 0,5 „ „ „
1 „ „ 24 + 0,8 „ „ „
1 „ „ 24 + 1,0 „ „ 0

e) 2 ccm Serum 24 + 1,6 ccm Caseïn } + 10 Tr. Essigsäure centrifugiert, neutralisiert + 0,6 ccm Milch + 1,0 ccm $CaCl_2$ { 0
2 „ „ 24 + 1,6 „ Paracaseïn — **Fällung**
2 „ „ 24 + 4,0 „ Caseïn — 0
2 „ „ 24 + 4,0 „ Paracaseïn — 0

Versuch XVIII.

Kaninchen 5 erhielt innerhalb 14 Tagen 5mal je 10 ccm Paracaseïn von der Konzentration der Milch intraperitoneal injiziert. 3 Tage nach der letzten Injektion Blutentnahme.

a) 1 ccm Serum 5 + 0,5 ccm Milch Fällung
1 „ „ 5 + 0,7 „ „ 0
1 „ H_2O + 0,5 „ „ + 0,5 ccm $CaCl_2$ 0
b) 1 „ Serum 5 + 2,0 „ H_2O + 0,5 „ Caseïnl. } + 4 Tr. Essigs. centr., neutr. + 0,3 ccm Milch { 0
1 „ „ 5 + 2,0 „ „ + 0,5 „ Paracaseïn — 0
1 „ „ 5 + 1,0 „ „ + 1,5 „ Caseïnl. } + 4 Tr. Essigs. centr., neutr. + 0,3 ccm Milch { 0
1 „ „ 5 + 1,0 „ „ + 1,5 „ Paracaseïn — 0

Kontrollen.

c) Laktoserum 11.
1 ccm Serum 11 + 0,5 ccm Milch Fällung
1 „ „ 11 + 0,8 „ „ „
1 „ „ 11 + 1,0 „ „ „
1 „ „ 11 + 1,5 „ „ „
1 „ „ 11 + 1,7 „ „ 0
d) 0,4 ccm Serum 11 + 2,6 ccm H_2O + 0,5 ccm Caseïnl. } +4Tr.Essigs.centr. neutr. + 0,3 Milch { 0
0,4 „ „ 11 + 2,6 „ „ + 0,5 „ Paracas. — **sof.Fllg.**

Versuch XIX.

Kaninchen 1 erhielt innerhalb 14 Tagen 5mal je 10 ccm Paracaseïn intraperitoneal. 5 Tage nach der letzten Injektion Blutentnahme. — Laktoserum 29.

a) 1 ccm Serum 1 + 0,5 ccm Milch }
1 „ „ 1 + 0,7 „ „ } Fällung
1 „ „ 1 + 0,9 „ „ }
1 „ „ 1 + 1,0 „ „ 0
b) 1 „ „ 29 + 1,0 „ „ }
1 „ „ 29 + 1,2 „ „ } Fällung
1 „ „ 29 + 1,5 „ „ }
1 „ „ 29 + 1,8 „ „ }
1 „ „ 29 + 2,0 „ „ 0
c) 1,0 ccm Serum 1 + 2,0 ccm H_2O + 0,9 ccm Caseïn } + 5 Tr. Essigs.; centrifugiert, neutralisiert + 0,5 ccm Milch { 0
1,0 „ „ 1 + 2,0 „ „ + 0,9 „ Paracas. — 0
0,5 „ „ 29 + 2,5 „ „ + 0,9 „ Caseïn — 0
0,5 „ „ 29 + 2,5 „ „ + 0,9 „ Paracas. — **Fällg.**

II. Das Präcipitin und die hemmenden Substanzen.

In meiner ersten Mitteilung habe ich bereits kurz darauf hingewiesen, daß das Laktopräcipitin bei Halbsättigung mit Ammonsulfat ausgesalzen wird und also mit den Globulinen sich abscheidet. Es war aber noch des genaueren zu ermitteln, welcher der erst in der neuesten Zeit eingehender studierten Globulinfraktionen denn das Präcipitin anhänge, ob dem Euglobulin oder dem Pseudoglobulin; das Fibrinoglobulin kam, da in demselben noch niemals wirksame Bestandteile der Immunsera aufgefunden werden konnten, von vornherein kaum in Betracht.

Zur Entscheidung dieser Frage wurden die Laktosera zunächst durch Zusatz des halben Volumens gesättigter Ammonsulfatlösung auf Drittelsättigung gebracht, der entstandene Niederschlag nach 24 Stunden abfiltriert, zwischen Filtrierpapier sorgfältig abgepreßt und in etwas weniger Wasser, als der ursprünglichen Serummenge entsprach, aufgelöst (Fraktion I, Euglobulin). Das Filtrat wurde dann, durch Zusatz der berechneten Menge Ammonsulfatlösung, halbgesättigt, das Pseudoglobulin (Fraktion II) auf dem Filter gesammelt, abgepreßt und wie

Fraktion I in Lösung gebracht. Zur Kontrolle wurde endlich auch die Albuminfraktion aus ihrer Lösung ausgesalzen und zu den nachfolgenden Versuchen verwendet.

Die so erhaltenen Lösungen wurden unter Zusatz von Milch und etwas Calciumchloridlösung auf die Anwesenheit des Präcipitins geprüft; eine Vergleichsprobe, welche nur Milch und Calciumchloridlösung, aber keine der 3 Fraktionen enthielt, hatte den Zweck, vor unliebsamen Täuschungen zu bewahren, denen man hin und wieder bei Milchen, welche aus unbekannter Ursache schon mit Chlorcalcium allein in der Kälte eine Fällung geben, unterliegen kann.

Versuch XX.

Kaninchen 14 erhielt innerhalb 14 Tagen 5 Injektionen zu je 10 ccm Kuhmilch intraperitoneal. 5 Tage nach der letzten Einspritzung wird das Tier aus der Carotis verbluten gelassen.

15 ccm des gewonnenen Serums werden mit 7,5 ccm gesättigter Ammonsulfatlösung versetzt, über Nacht stehen gelassen, dann abfiltriert. Der Niederschlag (Fraktion I) wird in 10 ccm Wasser gelöst. Das Filtrat (18 ccm) wird durch Zusatz von 6 ccm Ammonsulfatlösung auf Halbsättigung gebracht, die II. so erhaltene Fraktion ebenfalls in 10 ccm Wasser gelöst. Endlich wird aus dem Filtrate von Fraktion II durch Eintragen von Ammonsulfat in Substanz das Serumalbumin abgeschieden und als Fraktion III in 10 ccm Wasser aufgelöst. Die 3 Fraktionen werden auf ihren Gehalt an Laktopräcipitin geprüft:

Frakt. I	1,0 ccm	Euglobul.	+ 0,5 $CaCl_2$	+ 0,4 Milch	Fällung innerh. wenig. Min.	
„ II	1,0 „	Pseudoglob.	+ 0,5 „	+ 0,4 „	nach 4 Stunden	0
„ III	1,0 „	Albumin	+ 0,5 „	+ 0,4 „	„ 4 „	0
Kontrolle	1,0 „	H_2O	+ 0,5 „	+ 0,4 „	„ 4 „	0

Versuch XXI.

Kaninchen 10 erhielt innerhalb 16 Tagen 6 Injektionen zu je 10 ccm Kuhmilch intraperitoneal. 4 Tage nach der letzten Injektion Blutentnahme.

20 ccm des durch Centrifugieren abgeschiedenen Serums werden mit 10 ccm Ammonsulfatlösung versetzt, über Nacht stehen gelassen und dann filtriert. Fraktion I wird nach sorgfältigem Abpressen zwischen Filtrierpapier in 15 ccm destillierten Wassers gelöst. Das Filtrat (25 ccm) wird durch Zusatz von 8,4 ccm Ammonsulfatlösung auf Halbsättigung gebracht; nach 6-stündigem Stehen wird Fraktion II abfiltriert und in 15 ccm Wasser aufgelöst. Die restierende Flüssigkeit wird mit Ammonsulfat gesättigt, das ausgesalzene Serumalbumin gleichfalls in 15 ccm Wasser gelöst. Prüfung auf die Anwesenheit von Laktopräcipitin:

Frakt. I	1,0 ccm	Euglobul.	+ 0,4 ccm Milch	+ 1,0 ccm $CaCl_2$	sofortige Fällung	
„ II	1,0 „	Pseudoglob.	+ 0,4 „ „	+ 1,0 „ „	nach 2 Stdn.	0
„ III	1,0 „	Albumin	+ 0,4 „ „	+ 1,0 „ „	„ 2 „	0
Kontrolle	1,0 „	H_2O	+ 0,4 „ „	+ 1,0 „ „	„ 2 „	0

Versuch XXII.

Kaninchen 1 erhielt innerhalb 14 Tagen 5 Injektionen zu je 10 ccm Kuhmilch intraperitoneal. 3 Tage nach der letzten Injektion Blutentnahme.

10 ccm des gewonnenen Serums werden mit 5 ccm Ammonsulfatlösung versetzt, der Niederschlag in 10 ccm destillierten Wassers gelöst. Das Filtrat (10 ccm) mit 3,4 ccm Ammonsulfat auf Halbsättigung gebracht, das abgeschiedene Pseudoglobulin in 10 ccm destillierten Wassers gelöst. Das restierende Filtrat mit Ammonsulfat in Substanz gesättigt, das Serumalbumin in 10 ccm Wasser gelöst. Prüfung auf Präcipitin:

Frakt. I	1,2 ccm	Euglobul.	+ 0,4 Milch	+ 1,0 $CaCl_2$	Fällung in wenigen Minuten
„ II	1,2 „	Pseudoglob.	+ 0,4 „	+ 1,0 „	0
„ III	1,2 „	Albumin	+ 0,4 „	+ 1,0 „	0
Kontrolle	1,2 „	H_2O	+ 0,4 „	+ 1,0 „	0

Aus diesen Versuchen (XX—XXII) geht hervor, daß nur die Euglobulinfraktion das Präcipitin enthält, während die Pseudoglobulin- und Albuminfraktion vollkommen unwirksam sind, ein Befund, welcher in bester Uebereinstimmung mit der von Pick (6) kürzlich mitgeteilten Thatsache steht, nach welcher die Fähigkeit, spezifische Niederschläge mit Typhuskulturfiltraten zu

geben, lediglich an das Euglobulin des Typhusimmunserums gebunden ist. — Die durch diesen Nachweis gegebene Möglichkeit, die wirksame Substanz des Laktoserums von einem beträchtlichen Teile der Eiweißkörper zu befreien, bot nun die willkommene Veranlassung, eine Frage wieder aufzunehmen, welche ich bereits in meiner früheren Arbeit berührt hatte, aber nicht zur vollständigen Entscheidung bringen konnte. Ich hatte daselbst versucht, wahrscheinlich zu machen, daß die hemmenden Substanzen, welche bei der Erhitzung des passend verdünnten Laktoserums auf 75° entstehen, aus dem Präcipitin ihren Ursprung nahmen, und hatte für diese Anicht vor allem jene Versuche ins Feld geführt, bei welchen durch Bindung und Entfernung des Präcipitins aus dem Serum die Entstehung dieser hemmenden Substanzen verhindert werden konnte.

Versuch XXIII.

Fraktion I (Euglobulin).

Laktoserum 29.

2 ccm Frakt. I + 6 H_2O (1/4 St. auf 75°) + 0,5 Milch + 1 $CaCl_2$ + 1 Laktos. 29 frisch Fällg.
2 „ „ I + 6 „ (1/4 „ „ 80°) + 0,5 „ + 1 „ + 1 „ 29 „ „
8 „ H_2O + 0,5 Milch + 1 $CaCl_2$ + 1 Laktos. 29 frisch „

Laktoserum 2.

2 ccm Frakt. I + 4 H_2O (1/4 St. auf 75°) + 0,5 Milch + 1 Laktoser. 2 frisch Fällg.
3 „ „ I + 5 „ (1/4 „ „ 75°) + 0,5 „ + 1 „ 2 „ „
8 „ H_2O + 0,5 Milch + 1 Laktoser. 2 frisch „

Laktoserum 17.

4 ccm Frakt. I + 4 H_2O (1/4 St. auf 75°) + 0,3 Milch + 0,3 Laktos. 9 frisch + 1 $CaCl_2$ Fällg.

Laktoserum 13.

1 ccm Frakt. I + 4 H_2O (1/4 St. auf 75°) + 0,3 Milch + 0,3 Laktos. 9 frisch + 1 $CaCl_2$ Fällg.
4 „ „ I + 4 „ (1/4 „ „ 75°) + 0,3 „ + 0,3 „ 9 „ + 1 „ „

Stets trat die Fällung hier rascher auf, als bei den Kontrollen (Fraktion II und III).

Versuch XXIV.

Fraktion II (Pseudoglobulin).

Laktoserum 25.

2 ccm Fr. II + 4 H_2O (1/4 St. bei 75°) + 0,4 Milch + 1,0 Laktos. 25 frisch + 1 $CaCl_2$ Fällg.
6 „ H_2O + 0,4 Milch + 1 Laktoser. 25 frisch + 1 $CaCl_2$ „

Laktoserum 10.

2 ccm Fr. II + 4 H_2O (1/4 St. bei 75°) + 0,5 Milch + 1 Laktoser. 10 frisch Fällg.

Laktoserum 29.

2 ccm Fr. II + 4 H_2O (1/4 St. bei 75°) + 0,5 Milch + 1 Laktos. 29 frisch Fällg.
2 „ „ II + 4 „ (1/4 „ „ 80°) + 0,5 „ + 1 „ 29 „ „

Laktoserum 2.

2 ccm Fr. II + 4 H_2O (1/4 St. bei 75°) + 0,5 Milch + 1 Laktos. 29 frisch Fällg.
4 „ „ II + 4 „ (1/4 „ „ 75°) + 0,5 „ + 1 „ 2 „ „
2 „ „ II + 4 „ (1/4 „ „ 80°) + 0,5 „ + 1 „ 2 „ „

Laktoserum 3.

3 ccm Fr. II + 3 H_2O (1/4 St. bei 75°) + 0,3 Milch + 0,3 Laktos. 6 frisch Fällg.
3 „ „ II + 3 „ (1/4 „ „ 75°) + 0,2 „ + 0,2 „ 6 „ „

Versuch XXV.

Fraktion III (Albumin).

Laktoserum 5.

2 ccm Fr. II + 4 H_2O (1/4 St. bei 75°) + 0,5 Milch + 1 $CaCl_2$ + 1,0 Ser. 5 frisch Fällg.

Laktoserum 29.

2 ccm Fr. III + 4 H_2O inakt. (1/4 St. bei 75°) + 0,5 Milch + 1 $CaCl_2$ + 1,0 S. 5 frisch Fällg.
4 „ „ III + 4 „ (1/4 St. bei 75°) + 0,5 Milch + 1 $CaCl_2$ + 1,0 Ser. 5 „ „
6 „ „ III (1/4 St. bei 75°) + 0,5 Milch + 1 $CaCl_2$ + 1,0 Ser. 5 frisch „

Laktoserum 2.

4 ccm Fr. III + 4 H_2O (1/4 St. bei 75°) + 0,3 Milch + 0,3 Laktoser. 6 Fällg.
5 „ „ III + 3 „ (1/4 „ „ 75°) + 0,3 „ + 0,3 „ 9 „

Laktoserum 3.

4 ccm Fr. III + 4 H_2O (1/4 St. bei 75°) + 0,2 Milch + 0,2 Laktos. 6 frisch Fällg.

Versuch XXVI.

Fraktion I. Euglobulin (dialysiert).

Laktoserum 10.
2 ccm Frakt. I + 4 H_2O (1/4 St. auf 75°) + 0,35 Milch + 1 $CaCl_2$ Fällg.
6 „ H_2O + 0,35 Milch + 1 $CaCl_2$ 0
Laktoserum 17.
2 ccm Frakt. I + 2 H_2O (1/4 St. auf 75°) + 0,3 Milch Fällg.
Laktoserum 13.
2 ccm Frakt. I + 4 H_2O (1/4 St. auf 75°) + 0,25 Milch + 1,0 $CaCl_2$ Fällg.
6 „ H_2O + 0,25 Milch + 1,0 $CaCl_2$ 0
Laktoser. 14.
2 ccm Frakt. I + 4 H_2O (1/4 St. auf 75°) + 0,25 Milch + 0,5 $CaCl_2$ Fällg.
Laktoserum 9.
2 ccm Frakt. I + 4 H_2O (1/4 St. auf 75°) + 0,2 Milch + 1 $CaCl_2$ Fällg.
6 „ H_2O + 0,2 Milch + 1 $CaCl_2$ 0

Ist diese Auffassung richtig, dann war zu erwarten, daß nur jene Fraktion bei der Erhitzung auf 75° hemmende Eigenschaften erwerben würde, welche das Präcipitin enthält, also nur die Euglobulinfraktion. — Auffallenderweise ergab nun aber, wie die untenstehenden Versuchsprotokolle zeigen (XXIII—XXV), zunächst keine der 3 in Rede stehenden Fraktionen irgend eine merkliche Hemmung der Laktoserumfällung[1]). Ja, ich machte sogar bei Fraktion I die Beobachtung, daß hier die Niederschlagsbildung viel schneller und prompter eintrat, als in der Kontrollprobe, welche kein erhitztes Serum enthielt, so daß also die auf 75° erhitzte Fraktion I sogar fällungsbegünstigende Eigenschaften zu besitzen schien.

Diese merkwürdige und zunächst ganz unverständliche Thatsache findet ihre sehr einfache Erklärung durch die folgenden Experimente (Vers. XXVI). Bringt man nämlich die erhitzte Fraktion I mit etwas Milch und Calciumchloridlösung zusammen, ohne, wie bei den Hemmungsversuchen, auch frisches Laktoserum zuzusetzen, so findet man, daß typische Fällung des Caseïns eintritt. Das bedeutet aber nichts anderes, als daß die isolierte Fraktion I nicht, wie das ganze Laktoserum, schon bei 75° inaktiviert wird, sondern erst bei höherer Temperatur, eine Thatsache, die nunmehr ganz selbstverständlich erscheinen läßt, daß diese Fraktion trotz der Erhitzung nicht nur keine hemmenden Eigenschaften besitzt, sondern sogar die Fällung noch befördert.

Um also die Entscheidung der uns beschäftigenden Frage zu ermöglichen, mußten die 3 isolierten Fraktionen auf höhere Temperatur als 75° erhitzt werden. Bei der Pseudoglobulin- und Albuminfraktion, welche in destilliertem Wasser vollkommen löslich sind und daher bis zum vollkommenen Verschwinden der Salze dialysiert werden können, hatte dies keine weitere Schwierigkeit. Wie Versuch XXVII u. XXVIII zeigt, kommt auch nach Erhitzung auf 90° keiner der beiden Fraktionen irgend eine hemmende Fähigkeit gegenüber der Wirkung des frischen Laktoserums zu. Schon dieser Befund macht es höchst wahrscheinlich, daß die Vorstufen der hemmenden Substanzen in der Fraktion I enthalten sind. Der direkte Nachweis dieser auf indirektem Wege erschlossenen Thatsache war jedoch nicht ohne

1) Da die Lösungen der 3 Fraktionen auch nach erfolgter Verdünnung durch die hohe Temperatur koaguliert wurden, so mußten dieselben mehrere Tage lang gegen destilliertes Wasser resp. gegen oft gewechselte physiologische Kochsalzlösung dialysiert werden, ehe sie zu diesen Versuchen benutzt werden konnten.

weiteres zu erbringen. Denn da das Euglobulin wegen seiner Unlöslichkeit in reinem salzfreien Wasser nicht so lange dialysiert werden konnte, bis alle Salze entfernt waren, so mußte eine noch ziemlich stark salzhaltige Flüssigkeit zu diesen Versuchen verwendet werden, welche aber beim Erhitzen auf 90°, wie leicht vorauszusehen war, koagulierte, und somit keine einwandfreien Resultate ergeben konnte. Um diese Schwierigkeit zu umgehen, mußte zu unserer Euglobulinlösung eine gerinnungshemmende Substanz hinzugefügt werden, welche jedoch — in den verwendeten Mengenverhältnissen weder die Laktoserumfällung noch die Entstehung der hemmenden Substanzen aus den Präcipitinen verhindern durfte. Als solche diente eine gesättigte Harnstofflösung, die im Verhältnis 1:2 oder höchstens 1:1 zu der Flüssigkeit hinzugesetzt, nur eine gewisse — zum Teil allerdings auch durch die Verdünnung bedingte — Verzögerung der Laktoserumfällung hervorrief, sonst aber ohne weiteren Einfluß auf dieselbe blieb. Zur Kontrolle wurden natürlich auch die beiden anderen Fraktionen mit genau den gleichen Mengen Harnstofflösung versetzt und auf 90° erwärmt. — Bemerkt sei noch, daß bei diesen Versuchen wie bei jenen ohne Harnstoffzusatz eine ausgiebige Dialyse erforderlich ist, da das Ammonsulfat als solches die Laktoserumfällung zu hemmen vermag, und daß, um die durch die Dialyse eintretende Verdünnung möglichst einzuschränken, die mit Hilfe des Ammonsulfats isolierten Fraktionen in der Hälfte des ursprünglichen Serumvolumens gelöst wurden. Das Ergebnis dieser Versuche (XXIX —XXXIV) entsprach nun in der That zunächst vollkommen den gehegten Erwartungen. Während Fraktion II wie III auch hier durch die Erhitzung keine hemmenden Eigenschaften erworben hatten, zeigte Fraktion I nunmehr nach der Inaktivierung die Fähigkeit, die Fällung des Caseïns durch das Laktoserum zu verhindern. Die gleiche Fähigkeit kam der Euglobulinfraktion des Paracaseïn- und des Jodcaseïnserums zu. Leider stellte sich jedoch bei der weiteren Verfolgung dieser Experimente heraus, daß auch Normalkaninchenserum bezw. dessen Globulin, welche bei einfacher Erhitzung auf 75°, wie ich in meiner ersten Mitteilung zeigen konnte, keine hemmenden Kräfte acquirieren, nach der Erhitzung mit Harnstoff hindernd auf die Laktoserumfällung einzuwirken vermögen, so daß also auch diese Versuche eine endgiltige direkte Entscheidung unserer Frage nicht herbeiführen. Soviel geht jedoch mit Sicherheit aus denselben hervor, **daß die Vorstufen der hemmenden Substanzen weder in der Pseudoglobulin- noch in der Albuminfraktion enthalten sind**, woraus sich

Versuch XXVII.

Fraktion II, dialysiert und auf 90° erhitzt.

Laktoserum 17.

2 ccm Fr. II + 6 H_2O (1/4 St. auf 90°) + 0,3 Milch + 0,6 Laktoser. 32 frisch + 0,5 $CaCl_2$ Fällg.
4 „ „ II + 4 „ (1/4 „ „ 90°) + 0,3 „ + 0,6 „ 32 „ + 0,5 „ „

Laktoserum 13.

2 ccm Fr. II + 6 H_2O (1/4 St. auf 90°) + 0,3 Milch + 0,6 Laktoser. 32 + 0,5 $CaCl_2$ Fällg.
4 „ „ II + 4 „ (1/4 „ „ 90°) + 0,3 „ + 0,6 „ 32 + 0,5 „ „
6 „ „ II + 6 „ (1/4 „ „ 90°) + 0,3 „ + 0,6 „ 32 + 0,5 „ „

Versuch XXVIII.

Fraktion III (Albumin), dialysiert und auf 90° erhitzt.

Die Flüssigkeiten zeigten zwar starke Opalescenz bis milchweiße Trübung, aber keine Koagulation des Eiweißes.

Laktoserum 17.

2 ccm Fr. III + 6 H_2O (1/4 St. auf 90°) + 0,3 Milch + 0,3 Laktoser. 16 frisch + 0,5 $CaCl_2$ Fällg.
3 „ „ III + 5 „ (1/4 „ „ 90°) + 0,3 „ + 0,3 „ 16 „ + 0,5 „ „

Laktoserum 9.

2 ccm Fr. III + 6 H_2O (1/4 St. auf 90°) + 0,3 Milch + 0,3 Laktoser. 16 + 0,5 $CaCl_2$ Fällg.
4 „ „ III + 6 „ (1/4 „ „ 90°) + 0,3 „ + 0,3 „ 16 + 0,5 „ „
6 „ „ III + 6 „ (1/4 „ „ 90°) + 0,3 „ + 0,3 „ 16 + 0,5 „ „

Versuch XXIX.

Fraktion I (dialysiert gegen physiol. NaCl-Lösung, Zusatz gesättigter Harnstofflösung, auf 90° erhitzt.

Laktoserrum 4, 34, 11.

4 ccm Ser. 4 } 0
4 „ „ 34 } + 2 ccm Harnst. (1/4 St. auf 90°) + 0,3 Milch + 0,3 Ser. 4 + 2 ccm $CaCl_2$ { 0
4 „ „ 11 } 0

Fraktion II (dialysiert gegen destill. Wasser).

4 ccm Ser. 4 } Fällg.
4 „ „ 34 } + 2 ccm Harnst. (1/4 St. auf 90°) + 0,3 Milch + 0,3 Ser. 4 + 2 ccm $CaCl_2$ { „
4 „ „ 11 } „

Fraktion III (Albumin) (dialysiert gegen destilliertes Wasser).

4 ccm Ser. 4 } Fällg.
4 „ „ 34 } + 2 ccm Harnst. (1/4 St. auf 90°) + 0,3 Milch + 0,3 Ser. 4 + 2 ccm $CaCl_2$ { „
4 „ „ 11 } „

Versuch XXX.

Laktoserum 32.

4 ccm Fr. I + 2 ccm Harnst. } 0
4 „ „ II + 2 „ „ } 20 Min. auf 90° + 0,3 ccm Milch + 0,3 Ser. 4 + 2 $CaCl_2$ { Fällg.
4 „ Alb. + 2 „ „ } „

Versuch XXXI.

Laktoserum 22.

4 ccm Fr. I + 2 ccm Harnst. } 0
4 „ „ II + 2 „ „ } 20 Min. bei 90° + 0,3 ccm Milch + 0,3 Ser. 22 + 2 $CaCl_2$ { Fällg.
4 „ Alb. + 2 „ „ } „

Versuch XXXII.

Laktoserum 14, 24, 7, 12.

Fraktion I.

3 ccm Ser. 7 + 1,5 ccm Harnst. } 0
4 „ „ 7 + 2,0 „ „ } 20 Min. auf 90° + 0,3 Laktos. 7 + 0,3 Milch + 2 $CaCl_2$ { 0
3 „ „ 12 + 1,5 „ „ } 0

Fraktion II.

4 ccm Ser. 14 + 2,0 ccm Harnst. } Fällg.
4 „ „ 12 + 2,0 „ „ } „
4 „ „ 12 + 1,5 „ „ } „
3 „ „ 12 + 1,5 „ „ } 20 Min. auf 90° + 0,3 Laktos. 7 + 0,3 Milch + 2 $CaCl_2$ { „
6 „ „ 24 + 2,0 „ „ } „
6 „ „ 12 + 2,0 „ „ } „
6 „ „ 14 + 2,0 „ „ } „

Fraktion III (Albumin).

6 ccm Alb. 24 + 2 ccm Harnst. } Fällg.
4 „ „ 7 + 2 „ „ } „
4 „ „ 12 + 2 „ „ } 20 Min. auf 90° + 0,3 Laktos. 7 + 0,3 Milch + 2 $CaCl_2$ { „
6 „ „ 7 + 3 „ „ } „
6 „ „ 12 + 3 „ „ } „

Versuch XXXIII.

Paracaseïnserum 10.

4 ccm Fr. I + 3 ccm Harnst. } 0
4 „ „ II + 3 „ „ } 1/4 St. auf 90° + 0,3 Laktos. 34 fr. + 0,3 Milch + 2 $CaCl_2$ { Fällg.
4 „ Alb. + 3 „ „ } „

Versuch XXXIV.

Jodcaseïnserum 16.

4 ccm Fr. I + 2 ccm Harnst. } 0
4 „ „ II + 2 „ „ } 20 Min. auf 90° + 0,3 Laktos. 34 + 0,3 Milch + 2 $CaCl_2$ { Fällg.
4 „ Alb. + 2 „ „ } „

mit einer gewissen Berechtigung per exclusionem der Schluß ableiten läßt, daß es nur die Fraktion I, die Euglobulinfraktion, sein kann, welche diese Substanzen beherbergt. Hiernach würde somit ein und

dieselbe Serumfraktion sowohl die Präcipitine als auch diejenigen Stoffe enthalten, die bei der Erhitzung in die hemmenden übergehen, ein Befund, der zwar an und für sich, wie eine von Pick mitgeteilte Thatsache lehrt[1]), nichts über den genetischen Zusammenhang dieser beiden wirksamen Substanzen auszusagen gestattet, welcher aber im Verein mit der bereits eingangs erwähnten Möglichkeit, durch Caseïnzusatz diese Vorstufen aus dem Serum zu entfernen, einen solchen Zusammenhang fast mit Sicherheit annehmen läßt.

Da ich in meiner ersten Publikation die Versuchsprotokolle dieser Bindungsversuche nicht ausführlich mitgeteilt habe und da ich ferner seither noch eine ganze Reihe derartiger Experimente angestellt habe, so möchte ich das Versäumte an dieser Stelle nachholen und lasse daher einige meiner diesbezüglichen Aufzeichnungen folgen (Versuch XXXV—XXXVIII). Ich verfüge nunmehr im ganzen über 11 positiv ausgefallene Versuche. — Die bereits in meiner ersten Abhandlung ausgesprochene Ansicht, nach welcher die hemmenden Substanzen als Präcipitoide, als Präcipitinderivate aufzufassen sind, hat somit durch die weiteren Untersuchungen noch erheblich an Wahrscheinlichkeit gewonnen.

III. Die Labhemmung durch erhitztes Normalserum.

In meiner bereits mehrfach citierten ersten Mitteilung habe ich auf eine, soviel ich weiß, bisher nicht beschriebene Art der Labhemmung aufmerksam gemacht, welche bei dem inaktivierten (auf 75° erhitzten) normalen Kaninchenserum zu beobachten ist. Setzt man nämlich zu der erhitzten Mischung von 2 ccm Serum und 4 ccm Wasser etwa $^1/_2$ ccm Milch, einige Tropfen Labessenz und 1 ccm 5-proz. Chlorcalciumlösung hinzu und erwärmt auf 40°, so bleibt die Fällung des Caseïns aus, während dieselbe in der serumfreien Kontrollprobe in der gewöhnlichen Weise eintritt. Ich konnte weiter zeigen, daß dieser Hemmungsvorgang weder auf einer Kalkbindung oder Kalkentziehung noch auf einer Bindung oder Beeinflussung des Labfermentes beruhen kann, da bei Zusatz eines Ueberschusses an Caseïn resp. an Milch die früher gehemmte Fällung nunmehr zu Tage tritt, wenn man die Mischung kurze Zeit auf 40° erwärmt. Ich schloß daraus, daß der Angriffspunkt der hemmenden Kräfte des inaktivierten Kaninchenserums weder an den Kalksalzen noch an dem Fermente der Labgerinnung liegen könne, sondern einzig und allein an dem Caseïn, welches in irgend einer, noch näher zu erforschenden Art und Weise vor der Koagulation und Ausfällung bewahrt wird.

Durch eine Reihe weiterer Versuche suchte ich nun näheren Aufschluß über den Mechanismus dieses Hemmungsvorganges zu erlangen.

Zunächst suchte ich die hemmenden Substanzen aus dem inaktivierten Serum durch verschiedene Reagentien abzuscheiden. Dies gelingt leicht durch verdünnte Essigsäure, welche, wie bereits in meiner früheren Arbeit erwähnt wurde, in den erhitzten Seren einen sehr voluminösen Niederschlag erzeugt; ebenso leicht kann man dieselben durch Halbsättigung mit Ammonsulfat zur Abscheidung bringen. Löst man

---

1) Pick fand nämlich, daß die durch Erwärmen auf 58—60° aus dem Typhusimmunpferdeserum entstehende koagulinhemmende Substanz zwar derselben Fraktion angehört wie die an der Koagulinbildung beteiligte Komponente, daß diese bei Substanzen aber trotzdem völlig unabhängig voneinander sind.

die erhaltenen Fällungen, eventuell durch Neutralisieren, wieder auf und prüft die Lösung auf ihre labhemmende Wirkung, so findet man dieselbe völlig ungeschwächt wieder, während die Filtrate von diesen Niederschlägen jede hemmende Eigenschaft eingebüßt haben.

Die tryptische Spaltung der Eiweißkörper des Serums vernichtet binnen kurzem diese merkwürdige Eigenschaft, beim Erhitzen labhemmende Substanzen zu liefern, wie die Versuche XXXIX und XL

Versuch XXXV.

Laktoserum 13, 14, 17 u. 9.

a) 1 ccm Ser. 13, 1 „ „ 14, 1 „ „ 17, 1 „ „ 9 } + 2 ccm H_2O + 1 ccm Milch 10 Minuten stehen gelassen } + 8 Tropfen Essigsäure, abcentrif. (2,8 ccm) neutralisiert, 1/4 Stunde auf 75° erwärmt, + 0,2 ccm Milch + 0,3 ccm Serum 9 { [illegible]

b) 1 ccm Ser. 13, 1 „ „ 14, 1 „ „ 17, 1 „ „ 9 } + 3 ccm H_2O, 1/4 Stunde auf 75° erwärmt } davon 2,8 ccm + 0,2 ccm Milch + 0,3 ccm Ser. 9 { 0, später geringe Fä[illegible]; 0, „ „; 0, „ 0; 0, „ 0

Versuch XXXVI.

Laktoserum 32.

a) 2 ccm Ser. 32 + 2 ccm Milch } + 5 Tr. Essigs. { abcentr. 2,4 ccm neutral. } + 4 H_2O } + 0,3 M[illegible]
b) 2 „ „ 32 + 2 „ H_2O } { 2,4 ccm neutral. } 1/4 St. auf 75° } + 0,6 S[illegible]

a) centrif.: starker Bodensatz
b) „ 0

c) 2 ccm Ser. 32 + 1 Milch + 1 H_2O } abcentrif. 3,2 ccm } + 4 H_2O } + 1,0 Ser. 32 { centrif. [illegible]
d) 2 „ „ 32 + 2 H_2O } 3,2 ccm } 1/4 St. auf 75° } + 0,5 Milch {

Versuch XXXVII.

Laktoserum 6.

a) 1 ccm Ser. 6 + 2 ccm H_2O + 1 ccm Milch } abcentrif. 2,8 ccm } 1/4 St. auf 75° + 0,25 { F[illegible]
b) 1 „ „ 6 + 3 „ H_2O } 2,8 ccm } Milch + 0,4 Ser. 6 { [illegible]

Versuch XXXVIII.

Laktoserum 17.

a) 1,5 ccm Ser. 17 + 1,5 Milch + 1,5 H_2O } + 0,2 Essigs. abcentrif. 3,5 } neutr. + 3,5 H_2O 1/4 St. auf { F[illegible]
b) 1,5 „ „ 17 + 3 H_2O } + 0,2 „ davon 3,5 } 75° + 0,3 Ser. 9 + 0,3 Milch { [illegible]

Versuch XXXIX.

10 ccm Normalkaninchenserum + 20 ccm destilliertes Wasser werden mit Pankreatin versetzt und unter Toluol bei 37° digeriert.

21. April:	6 ccm Mischg. 1/4 St. bei 75°, + 0,5 Milch + 0,2 Lab + 1 $CaCl_2$	0
	6 „ H_2O + 0,5 Milch + 0,2 Lab + 1 $CaCl_2$	sofortige Fällung
25. „	6 „ Mischg. 1/4 St. bei 75°, + 0,5 Milch + 0,2 Lab + 1 $CaCl_2$	0
	6 „ H_2O + 0,5 Milch + 0,2 Lab + 1 $CaCl_2$	sofortige Fällung
28. „	6 „ Mischg. 1/4 St. bei 75°, + 0,5 Milch + 0,2 Lab + 1 $CaCl_2$	Fäll., etw. verzög.
	6 „ H_2O + 0,5 Milch + 0,2 Lab + 1 $CaCl_2$	sofortige Fällung

Versuch XL.

10 ccm Normalkaninchenserum + 20 ccm destilliertes Wasser werden mit Pankreatin versetzt und unter Toluol bei 37° digeriert.

27. April:	6 ccm Mischg. 1/4 St. bei 75°, + 0,5 Milch + 0,2 Lab + 1 $CaCl_2$	0
	6 „ H_2O + 0,5 Milch + 0,2 Lab + 1 $CaCl_2$	sofortige Fällung
29. „	6 „ Mischg. 1/4 St. bei 75°, + 0,5 Milch + 0,2 Lab + 1 $CaCl_2$	0
	6 „ H_2O + 0,5 Milch + 0,2 Lab + 1 $CaCl_2$	sofortige Fällung
1. Mai:	6 „ Mischg. 1/4 St. bei 75°, + 0,5 Milch + 0,2 Lab + 1 $CaCl_2$	„ „
	6 „ H_2O + 0,5 Milch + 0,2 Lab + 1 $CaCl_2$	„ „

zeigen. Man wird daher wohl annehmen dürfen, daß dieselbe an die Eiweißsubstanzen als solche und nicht an irgendwelche andere Substanzen geknüpft ist, welche zwar mit den Eiweißkörpern gefällt werden, aber sonst denselben fernstehen.

In welcher Weise kommt nun die Hemmung der Labkoagulation des Caseïns durch das inaktivierte Serum zustande? Daß den Angriffspunkt des hemmenden Agens weder das Labferment noch die Kalksalze bilden, sondern das Caseïn selbst, haben wir bereits hervorgehoben;

es bleibt aber noch fraglich, inwieweit das letztere hierbei der fermentativen Spaltung in Paracaseïn und Molkeneiweiß unterliegt; mit anderen Worten, es wäre denkbar, daß entweder das Caseïn vor dieser Spaltung durch die hemmenden Substanzen geschützt würde, oder aber, daß dasselbe in gewöhnlicher Weise der Fermentwirkung unterläge, daß aber die Abscheidung des entstandenen Paracaseïns durch das inaktivierte Serum verhindert würde. Um diese Frage zu entscheiden, war es zunächst notwendig, sich darüber zu orientieren, ob überhaupt das erhitzte Serum die Fähigkeit besitzt, Paracaseïn bei Gegenwart von Kalksalzen in Lösung zu erhalten. Wie aus den Versuchen XLI hervorgeht, muß diese Frage bejaht werden, so daß also die Möglichkeit, die Hemmungswirkung durch das Gelöstbleiben des Paracaseïns zu erklären, zugegeben werden muß. Ob diese Erklärung aber thatsächlich richtig ist, ob also wirklich unter den gedachten Verhältnissen eine Spaltung des Caseïns erfolgt, darüber mußten weitere Versuche angestellt werden, welche den Nachweis des charakteristischen Spaltungsproduktes, des Molkeneiweißes, zum Ziele hatten. Das Verfahren war dasselbe, welches ich mich in meiner ersten Mitteilung zum Studium der Frage bedient hatte, ob bei der Laktoserumfällung des Caseïns Molkeneiweiß abgespalten wird, und kann ich daher diesbezüglich auf die an diesem Orte gegebene Beschreibung desselben, sowie auf die folgenden Versuchsprotokolle verweisen. Es wurden wieder 3 Reihen von Experimenten angestellt, und zwar

a) mit dem inaktivierten Serum, Caseïn (kalkfrei) und Lab,
b) mit Caseïn und Lab (ohne Serum),
c) mit Caseïn unter Zusatz von etwas Serum, ohne Lab.

Versuchsreihe c diente als Kontrolle für die Vollständigkeit der Abscheidung der koagulablen Eiweißkörper durch das gedachte Verfahren (Versuch XLII—XLIV).

Natürlicherweise war bei diesen Versuchen die Caseïnmenge so bemessen, daß die verwendete Quantität inaktivierten Serums ausreichte, dieselbe vor der Fällung zu bewahren.

Aus den Versuchsprotokollen geht nun unzweifelhaft hervor, daß in der That, trotz der hemmenden Wirkung des erhitzten Serums, Molkeneiweiß aus dem Caseïn abgespalten wird. Damit ist aber der Mechanismus dieses Hemmungsvorganges klargelegt und läßt sich kurz in folgender Weise darstellen: Durch das inaktivierte ($^1/_4$ Stunde auf 75° erhitzte) Kaninchenserum wird die Einwirkung des Labfermentes auf das Caseïn nicht verhindert, sondern nur bewirkt, daß das entstandene Paracaseïn, trotz Anwesenheit von Kalksalzen, in Lösung bleibt.

Die Gesamtergebnisse dieser Arbeit lassen sich nun in folgender Weise zusammenfassen:

1) Durch Immunisierung mit den peptischen und tryptischen Spaltungsprodukten des Caseïns ließ sich kein caseïnfällendes Immunserum erzielen.

2) Die erhaltenen Sera zeigten auch keine irgend bemerkenswerte präcipitierende Fähigkeit gegenüber den Caseïnderivaten, welche zur Injektion verwendet worden waren.

Versuch XLI.

Normalkaninchenserum A. Paracaseïn, frisch bereitet, von derselben Konzentration wie die Milch.

2 ccm Ser. + 4 H_2O (1/4 St. bei 75°) + 0,5 Paracas. + 0,5 $CaCl_2$ 0
6 „ H_2O + 0,5 Paracaseïn + 0,5 $CaCl_2$ sofortige Fällung

Normalkaninchenserum B. Paracaseïn, Konzentration der Milch.

2 ccm Ser. + 4 H_2O (1/4 St. bei 75°) + 0,5 Paracas. + 0,5 $CaCl_2$ 0
2 „ „ + 4 „ (1/4 „ „ 75°) + 1,0 „ + 0,5 „ Fällung[1])
6 „ H_2O + 0,5 Paracaseïn + 0,5 $CaCl_2$ sofortige Fällung

Normalkaninchenserum C. Frisch bereitetes Paracaseïn.

2 ccm Ser. + 4 H_2O (1/4 St. bei 75°) + 0,5 Paracas. + 0,5 $CaCl_2$ 0
6 „ H_2O + 0,5 Paracaseïn + 0,5 $CaCl_2$ Fällung

Normalkaninchenserum D. Frisch bereitetes Paracaseïn.

2 ccm Ser. + 4 H_2O (1/4 St. bei 75°) + 0,5 Paracas. + 0,5 $CaCl_2$ 0[2])
2 „ „ + 4 „ (1/4 „ „ 75°) + 1,0 „ + 0,5 „ Fällung (part.)
6 „ H_2O + 0,5 Paracaseïn + 0,5 $CaCl_2$ Fällung

Normalkaninchenserum E. Frisches Paracaseïn.

2 ccm Ser. + 4 H_2O (1/4 St. auf 75°) + 0,5 Paracas. + 2 $CaCl_2$ 0
6 „ H_2O + 0.5 Paracaseïn + 2 $CaCl_2$ Fällung

Versuch XLII a.

20 ccm Normalkaninchenserum werden mit 40 ccm Wasser versetzt und 1/4 Stunde auf 75° erhitzt. Nach dem Erkalten werden 6 ccm einer reinen Caseïnlösung hinzugefügt, welche dieselbe Konzentration hatte wie die Milch, aus welcher das Caseïn (durch Essigsäurefällung) dargestellt worden war. Nach weiterem Zusatz von 0,5 ccm Labessenz wird das Gemisch 5 Minuten auf 40° erwärmt und dann das Caseïn mit der Hauptmasse der durch die Hitze veränderten Eiweißkörper durch Zusatz einiger Tropfen verdünnter Essigsäure abgeschieden. Das neutralisierte Filtrat wird mit mehr als dem gleichen Volumen gesättigter Ammonsulfatlösung gemischt und 1/2 Tag stehen gelassen, worauf der entstandene flockige Niederschlag auf dem Filter gesammelt und in 8 ccm destillierten Wassers gelöst wird. Diese Lösung wird mit Kochsalz gesättigt und am siedenden Wasserbad durch 5 Minuten gekocht, wobei sich die noch vorhandenen koagulablen Eiweißkörper vollkommen abscheiden und ein wasserklares Filtrat erhalten wird.

Versuch XLII b.

60 ccm Wasser werden mit 6 ccm der Caseïnlösung, 0,5 ccm Labessenz versetzt und 5 Minuten auf 40° erwärmt, worauf das Paracaseïn durch verdünnte Essigsäure gefällt wird und das Filtrat genau in derselben Weise behandelt wird wie bei a.

Versuch XLII c.

60 ccm Wasser werden mit 6 ccm der Caseïnlösung und 2 ccm Kaninchenserum versetzt, ohne weiteres mit Essigsäure gefällt und wie a weiter behandelt.

Je 4 ccm der erhaltenen Filtrate a, b und c werden mit 4 ccm Wasser verdünnt und mit 3 Tropfen Essigsäure und 1/2 ccm einer verdünnten Gerbsäurelösung versetzt.

Resultat:

a) Starke, flockige Trübung
b) „ „ „
c) Vollkommen klar

Essigsäureferrocyankalium bringt bei keiner der 3 Proben eine Trübung hervor.

Versuch XLIII a.

20 ccm Normalkaninchenserum + 40 ccm H_2O, 1/4 Stunde bei 75°; 5 ccm Caseïnlösung (Konzentration der Milch), 0,5 ccm Labessenz. Wie oben geschildert, weiter behandelt. Der schließlich erzielte Niederschlag in 7 ccm H_2O gelöst, mit NaCl auf dem siedenden Wasserbade gesättigt, filtriert.

Versuch XLIII b.

60 ccm H_2O + 5 ccm Caseïn + 0,5 Lab. Der Niederschlag in 7 ccm H_2O gelöst. Wie oben.

Versuch XLIII c.

60 ccm H_2O + 5 ccm Caseïn + 4 ccm Serum. Wie oben, Niederschlag in 7 ccm H_2O gelöst.

1) Nach Centrifugieren ist die Flüssigkeit noch milchig getrübt, da nur ein Teil des Caseïns ausgefallen ist.

2) Auch beim Erwärmen tritt keine Fällung ein.

Je 4 ccm der 3 erhaltenen Lösungen mit der gleichen Menge Wasser verdünnt, 3 Tropfen Essigsäure + 0,5 ccm verdünnter Gerbsäurelösung.

Resultat:

a) Starke flockige Trübung
b) Flockige Trübung, etwas schwächer wie a
c) Vollkommen klar

Essigsäureferrocyankalium trübt keine der 3 Proben.

Versuch XLIVa.

30 ccm Normalkaninchenserum + 60 ccm H_2O $^1/_4$ Stunde bei 75°, dazu 7,5 ccm Milch und 1 ccm Labessenz. Wie oben geschildert, weiter behandelt. Niederschlag in 7 ccm Wasser gelöst, mit Kochsalz auf dem Wasserbade gesättigt, filtriert.

Versuch XLIVb.

90 ccm Wasser + 7,5 ccm Milch + 1 ccm Labessenz. Der schließlich erhaltene Niederschlag in 7 ccm H_2O gelöst. Wie oben.

Versuch XLIVc.

90 ccm Wasser + 7,5 ccm Milch 5 ccm Normalserum. Fällung in 7 ccm H_2O gelöst.

Je 4 ccm der Lösungen a, b und c mit der gleichen Menge Wasser verdünnt, + 3 Tropfen Essigsäure + 0,5 ccm Gerbsäurelösung.

Resultat:

a) Starke, flockige Trübung
b) „ „ „
c) Spur Opalescenz

Essigsäureferrocyankalium erzeugt keine oder nur spurenweise Trübung.

Versuch XLV.

Kontrolle, um zu zeigen, daß bei der Erhitzung des Serums auf 75° keine Albumosen entstehen.

20 ccm Normalserum + 40 ccm H_2O $^1/_4$ Stunde auf 75°, mit verdünnter Essigsäure gefällt, centrifugiert, neutralisiert; mehr als das gleiche Volumen Ammonsulfat zugesetzt; der Niederschlag nach 24 Stunden filtriert, in 10 ccm Wasser gelöst, mit NaCl gesättigt, gekocht. Das Filtrat, mit gleichem Volumen Wasser verdünnt, giebt mit verdünnter Essigsäure und Gerbsäure keine Fällung oder Opalescenz.

3) Hingegen rief die Injektion von Labparacaseïn sowie von Jodcaseïn die Bildung von Präcipitinen hervor, welche Caseïn niederzuschlagen vermochten.

4) Es ließ sich zeigen, daß das Präcipitin des Paracaseïnserums von dem des Laktoserums verschieden sein muß, indem nur das erstere durch Paracaseïn gebunden wird.

5) Das Präcipitin des Laktoserums ist in der Euglobulinfraktion enthalten.

6) Durch Erhitzen der Euglobulinfraktion gehen, wie es scheint, aus derselben Substanzen hervor, welche die Laktoserumfällung zu hemmen imstande sind; Pseudoglobulin und Albumin bleiben unwirksam.

7) Die labhemmenden Substanzen des erhitzten Normalkaninchenserums können durch verdünnte Essigsäure oder durch Halbsättigung mit Ammonsulfat gefällt werden.

8) Trypsinverdauung vernichtet binnen kurzem die Fähigkeit des Normalserums, beim Erhitzen labhemmende Substanzen zu liefern.

9) Das erhitzte Normalserum vermag Paracaseïn bei Gegenwart von Kalksalzen in Lösung zu erhalten.

10) Trotz der Hemmung der sichtbaren Abscheidung des Caseïns wird Molkeneiweiß aus demselben abge-

spalten. **Somit wird die Einwirkung des Labfermentes auf das Caseïn durch das inaktivierte Serum nicht verhindert.**

Litteratur.

1) Arch. f. Hyg. Bd. XLIV.
2) Zeitschr. f. Hyg. Bd. XXXVII.
3) Arch. f. exper. Pathol. Bd. XLVI.
4) Wiener klin. Rundschau. 1902. No. 15.
5) Ber. d. deutsch. chem. Gesellsch. Bd. XXX. p. 1824.
6) Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. von F. Hofmeister. Bd. I.

Beitrag zum v. Drigalski-Conradi'schen Verfahren des Typhusbacillennachweises und zur Identifizierung typhusverdächtiger Bacillen durch die Agglutinationsprobe.

[Aus der hygienisch-bakteriologischen Untersuchungsstelle des XV. Armeekorps. Vorstand: Oberstabsarzt Dr. Musehold.]

Von **P. Klinger,** Assistenzarzt beim 3. Unterelsäss. Inf.-Reg. No. 138.

Vor mehreren Monaten veröffentlichten v. Drigalski und H. Conradi (1) in der Zeitschr. f. Hygiene u. Infektionskrankheiten ein neues elektives Verfahren zum Nachweise von Typhusbacillen, das vor allem darin seinen Wert habe, daß die Anzüchtung bei Bluttemperatur, also sehr rasch, vor sich geht und daß man die Typhuskolonieen mit Leichtigkeit makroskopisch von den Coli- und anderen Kolonieen trennen könne.

Herr Oberstabsarzt Musehold lernte im November 1901 gelegentlich der Gelsenkirchener Epidemie die Bereitung und Anwendung des Nährbodens durch unmittelbare Unterweisung seitens des Herrn v. Drigalski kennen und legte sein auf Grund der bisherigen Untersuchungen gewonnenes Urteil über den Wert der v. Drigalski-Conradi'schen Methode in seiner jüngst erschienenen Arbeit: „Zur Bekämpfung des Typhus" (2) nieder. Er bezeichnete das Verfahren „als ein in der Hand eines kundigen Bakteriologen nutzbringend zu verwendendes Werkzeug, das mit Bedacht gehandhabt werden will und dessen Wert erst nach Durchprüfung bei größeren Epidemieen in richtiger Weise erkannt werden wird". Insbesondere legte er nach der Richtung hin Kritik an, inwieweit man sich auf die von v. Drigalski und Conradi zur Identifizierung der typhusverdächtigen Kolonieen angewendete Agglutinationsprobe verlassen kann. Von diesen Gesichtspunkten nahm auch die vorliegende Arbeit ihren Ausgang.

Bei den wenigen Typhusfällen, die wir seit Dezember vorigen Jahres bisher (Ende Juli 1902) im hiesigen Laboratorium nach der neuen Methode zu untersuchen Gelegenheit hatten, trafen wir verdächtige Kolonieen auf fast allen unseren Platten an. Die meisten konnten mittels der Agglutinationsprobe schnell ausgeschieden werden. Jedoch gelang dies nicht bei allen; auch die weiteren von v. Drigalski und H. Conradi angegebenen differentialdiagnostischen Kennzeichen — Nichtveränderung des Traubenzuckerneutralrotagars und geringe Säuerung in Lackmusmolke — reichten in einigen Fällen nicht aus.

Schon in Gelsenkirchen gelang es O. St. A. M. einen aus dem Stuhle eines Typhuskranken gezüchteten Bacillus (D. U.), der den in

der angeführten Arbeit angegebenen Kriterien v. Drigalski's und H. Conradi's für Typhusbacillen standhielt, mittels der Gelatinekultur als Nichttyphus zu erkennen.

Ein zweiter nach dem v. Drigalski-Conradi'schen Verfahren in Gelsenkirchen gewonnener Stamm (St. 34) erwies sich bei der von mir im hiesigen Laboratorium vorgenommenen Nachprüfung als kein Eberth'scher Bacillus.

Ein dritter Spaltpilz (S. R.), der den Kriterien v. Drigalski's und H. Conradi's entsprach, wurde von mir aus dem Urin eines Soldaten (Schn.) gewonnen, welcher an fieberhaftem Magendarmkatarrh erkrankt war, — und schließlich gehört wenigstens teilweise ein Bacillus (B. R.) hierher, der aus dem Stuhle eines an Lungenentzündung leidenden, typhusverdächtigen Sanitätsunteroffiziers (Br.) gezüchtet wurde. Die beiden letzteren Stämme fanden sich auf den mit zahlreichen anderen Kolonieen besäten Platten nur in je einer Kolonie vor und wurden bei späteren Untersuchungen nicht wieder angetroffen.

In beifolgender Tabelle sind die morphologischen und biologischen Eigenschaften der erwähnten 4 Bakterienstämme zusammengestellt. Zum Vergleiche wurde die Untersuchung je eines Typhus- und Coli-Bacillus mittels derselben Nährmedien vorgenommen. Der Typhusspaltpilz (Ta. R. G.) stammt aus dem Reichsgesundheitsamte und diente gewöhnlich zur Vornahme der Widal'schen Probe. Das Ba. coli (G.) fand sich in Gelsenkirchen auf einer v. Drigalski-Conradi'schen Platte und fiel durch seine hohe Agglutinabilität mit Ziegenimmunserum (1 : 1000) auf.

Das Wachstum der 3 Stämme D. U., St. 34 und S. R. auf den v. Drigalski-Conradi'schen Platten unterschied sich in den ersten 24 Stunden, also in der für die Untersuchung bestimmten Zeit, in nichts von dem des Eberth'schen Bacillus. Die Kolonieen des Stammes B. R. dagegen sind rötlich gefärbt und zeigen nicht die glasige Beschaffenheit der Typhuskolonieen. Wenn man aber in Betracht zieht, daß die Ausgangskolonie zwischen zahlreichen weinhefefarbenen Coli-Kolonieen vorgefunden wurde, so wird man einen anfänglichen Irrtum um so leichter verstehen, da eine von der Platte vorgenommene Agglutinationsprobe stark positiv ausfiel (1 : 1000). Die 24-stündige Kultur in Lackmusmolke klärte allerdings den Irrtum bald auf.

Von besonderem Interesse ist, daß der Neutralrotagar von sämtlichen 4 Stämmen nicht verändert wurde. Dieser Nährboden galt wohl bisher nach den Untersuchungen von Rothberger (3) und Scheffler (4) als ein sicheres Mittel, um den echten Typhusbacillus von Coli und coliähnlichen Bacillen zu scheiden, und erst im April dieses Jahres veröffentlichte Kayser (5) Untersuchungen, in denen er nachwies, daß acht zwischen Ba. typhi und coli stehende Spaltpilze auf dem v. Drigalski-Conradi'schen Nährboden zwar typhusähnliche Kolonieen bilden, sich aber leicht von den authentischen Eberth'schen Bacillen durch ihr Verhalten zum Neutralrotagar trennen ließen. Wenn auch die Stämme D. U., St. 34 und S. R. nicht der Coli-Gruppe zugewiesen werden können, gleicht der Stamm B. R., abgesehen von der mangelnden Gas- und Indolbildung, dem Coli-Bacillus in allen seinen Eigenschaften, würde also als ein Paracolibacillus bezeichnet werden können.

Die Stämme D. U. und St. 34 haben sämtliche morphologischen und kulturellen Merkmale gemeinsam und auch die beiderseitigen

	Ta. R. G. (Reichsgesundheitsamt)	D. U. (aus Stuhl Gelsenkirchen)	St. 34 (aus Stuhl Gelsenkirchen)	S. R. (aus Urin)	B. R. (aus Stuhl)	B. coli G. (aus Stuhl in Gelsenkirchen)
Form und Beweglichkeit (20-stündige Agarkultur)	Lebhaft bewegliche, schlanke Stäbchen, daneben längere Fäden	Lebhaft bewegliche, sehr kurze Stäbchen, keine längeren Fäden	Wie D. U.	Sehr lebhaft bewegliche, schlanke Stäbchen, keine Fadenbildung	Sehr lebhaft bewegliche, etwas plumpe Stäbchen, keine Fadenbildung	Mäßig bewegliche, schlanke Stäbchen, keine Fadenbildung
Färbbarkeit	Agarkulturen ziemlich leicht, Kartoffelkulturen äußerst schwer mit den gebräuchlichen Anilinfarben färbbar. Gram negativ	Agar- und Kartoffelkulturen leicht färbbar. Gram negativ	do.	Wie D. U.	Wie D. U.	Wie D. U.
Bouillon nach 24 Stunden	Gleichmäßige Trübung, geringer Bodensatz	Trübung mit Flöckchenbildung, flockiger Bodensatz, Oberflächenhäutchen	do.	Trübung mit Flöckchenbildung, flockiger Bodensatz	Gleichmäßige Trübung, starker Bodensatz	Wie B. R.
Gelatinestich nach 4 Tagen bei Zimmertemperatur	Keine Verflüssigung. Wachstum längs des ganzen Stiches, geringe, blattartige Ausbreitung auf der Oberfläche	Keine Verflüssigung. Wachstum längs des ganzen Stiches, auf der Oberfläche porzellanweißer, trockener, halbkugeliger, höckerig zerklüfteter Belag von ca. 2 mm im Durchmesser	do.	Keine Verflüssigung. Wachstum längs des ganzen Stiches. Auf der Oberfläche grauweißer, feuchter, runder, leicht erhabener, glatter Belag von ca. 1,5 mm Durchmesser	Keine Verflüssigung. Wachstum längs des ganzen Stiches. Auf der Oberfläche gelblicher, feuchter, unregelmäßig gestalteter, flacher Belag, größter Durchmesser 2 mm	Keine Verflüssigung. Wachstum längs des ganzen Stiches. Auf der Oberfläche grauweißer, feuchter, runder, wenig erhabener Belag von ca. 1,5 mm Durchmesser
Schräge Gelatine (Strichkultur) nach 4 Tagen bei Zimmertemperatur	Feiner, grauweißer, durchsichtiger Belag	Porzellanweißer, stark erhabener, trockener, höckerig zerklüfteter Belag	Wie D. U., nur etwas zarteres Wachstum	Grauweißer, dicker, feuchter Belag	Gelblicher, dicker, feuchter Belag	Grauweißer, dicker, feuchter Belag

Gelatineplatte	Nach 2 Tagen die oberflächlichen Kolonieen unregelmäßig weinblattartig umrandet, fein gefurcht, mit Nabel, die tiefliegenden rundlich, scharfrandig, gelblich bis bräunlich, kaum granuliert	Nach 2 Tagen sandkorngroße, im auffallenden Lichte porzellanweiß, im durchfallenden dunkelbraun erscheinende Kolonieen, annähernd rund oder oval, mit unregelmäßig gekerbtem Rande, grobkörnig, wie aus einzelnen, sich teilweise deckenden Schollen zusammengefügt. Die oberflächlichen knopfförmig	Wie D. U.	Nach 2 Tagen die oberflächlichen Kolonieen ca. 1 mm im Durchmesser, grauweiß, rund, knopfförmig, mit Nabel, die tiefen rund oder oval, kleiner. Bei schwacher Vergrößerung erscheinen die Kolonieen braun, sämtlich in der Mitte mit einer rosettenartigen Zeichnung	Nach 2 Tagen die oberflächlichen Kolonieen gelblichgrau, rund, leicht erhaben, fein gekörnt, einzelne gefurcht, mit Nabel, ca. 1 mm Durchmesser. Die tiefen gelblich, rund oder oval, fein gekörnt. Nach 8 Tagen ist die Gelatine stellenweise getrübt und interferierend	Nach 2 Tagen die oberflächlichen Kolonieen grauweiß, blattartig begrenzt, mit zarter Furchung und Nabel, flach oder nur leicht erhaben. Die tiefliegenden gelblich, rund oder oval, mit glattem Rande
Schräger Agar	Nach 24 Stunden grauweißer, zarter, transparenter Belag	Nach 24 Stunden wie Ta. R. G. Nach 4 Tagen Belag gelblich	do.	Nach 24 Stunden grauweißer, dicker, transparenter, etwas körnig erscheinender Belag	Nach 24 Stunden grauweißer, dicker, transparenter Belag	Nach 24 Stunden grauweißer, dicker, transparenter Belag
Milch	Nach 20 Tagen nicht geronnen	Nach 9 Tagen geronnen	Nach 6 Tagen geronnen	Nach 16 Tagen geronnen	Nach 2 Tagen geronnen	Nach 24 Stunden geronnen
Kartoffel (Scheiben derselben Kartoffel)	Nach 24 Stunden deutlich sichtbarer, grauweißer, feuchter Belag. Nach 4 Tagen Belag leicht gelblich	Nach 24 Stunden grauweißer, feuchter Belag. Später keine Veränderung	Wie D. U.	Nach 24 Stunden gelblicher, feuchter, dicker Belag. Später keine Veränderung	Nach 24 Stunden graugelblicher, trockener, dicker Belag. Später keine Veränderung	Nach 24 Stunden graugelblicher, etwas feuchter, dicker Belag. Später keine Veränderung
Indolbildung	Negativ nach 24 Stunden. Negativ nach 5 Tagen	Wie Ta. R. G.	Wie Ta. R. G.	Wie Ta. R. G.	Wie Ta. R. G.	Positiv nach 24 Stunden
Gärungsröhrchen	Wachstum in beiden Schenkeln, keine Gasbildung	do.	do.	do.	do.	Wachstum in beiden Schenkeln, reichliche Gasbildung in 24 Stunden

	Ta. R. G. (Reichsgesundheitsamt)	D. U. (aus Stuhl Gelsenkirchen)	St. 34 (aus Stuhl Gelsenkirchen)	S. R. (aus Urin)	B. R. (aus Stuhl)	B. coli G. (aus Stuhl in Gelsenkirchen)
Lackmusmolke (nach 3 Tagen)	Ganz leichte Rötung, keine sichtbare Trübung. 0,7 Proz. Säure	Rötung, leichte Trübung. 3,5 Proz. Säure	Rötung, leichte Trübung. 3,3 Proz. Säure	Leichte Rötung und Trübung. 1,2 Proz. Säure	Intensive Rötung und Trübung nach 24 Stunden. Nach 3 Tagen starker Bodensatz, Flüssigkeit darüber klar, hellorange. 8,9 Proz. Säure	Intensive Rötung und Trübung. 15,2 Proz. Säure
Traubenzuckerneutralrotagar (Stich)	Wachstum längs des ganzen Stiches, spärliches Oberflächenwachstum. Nach 10 Tagen weder Gasbildung noch Veränderung der Farbe	Wachstum längs des ganzen Stiches, Oberfläche in ca. 4 Tagen vollständig überwuchert. Weder Gasbildung noch Veränderung der Farbe in 10 Tagen	Wie D. U.	Wie D. U.	Wie D. U.	Nach 24 Stunden Nährboden durch zahlreiche Gasblasen zerrissen, nach 48 Stunden grünlichgelbe Fluorescenz und in der Kuppe beginnende Aufhellung, die nach 5 Tagen fast vollendet ist
Platte nach v. Drigalski-Conradi	Nach 24 Stunden hellblaue, glasige, tautropfenähnliche Kolonieen von 1—2 mm Durchmesser. Nach ca. 3 Tagen Kolonieen dunkelblau, mit hellerem, glasigem Hofe, 2—4 mm im Durchmesser	Nach 24 Stunden wie Ta. R. G. Nach ca. 3 Tagen sind die Kolonieen größer, einzelne doppelt konturiert, manche mit höckerig zerklüfteter Oberfläche, braungelb	Nach 24 Stunden wie Ta. R. G. Nach 3 Tagen wie D. U.	Nach 24 Stunden wie Ta. R. G. Nach ca. 3 Tagen sind die Kolonieen größer, einzelne braungelb	Nach 24 Stunden Kolonieen rötlich, etwas matt, größer als die des Ta. R. G. Später Rötung intensiver	Nach 24 Stunden rote, matte, runde Kolonieen von 3—5 mm Durchmesser. Später keine wesentliche Veränderung
Agglutination mit Ziegenimmunserum	$^1/_{12000}$ fast vollständig in $^1/_2$ Stunde	$^1/_{250}$ vollständig in 15 Minuten. $^1/_{1000}$ sofort deutliche Häufchenbildung, komplett in 1 Stunde. $^1/_{2000}$ negativ in 1 Stunde	Wie D. U.	$^1/_{250}$ vollständig in 10 Minuten. $^1/_{1000}$ sofort deutliche Häufchenbildung, in 1 Stunde fast komplett. $^1/_{2000}$ negativ in 1 Stunde	Wie S. R.	Wie S. R.

Immunsera gleichen sich in ihrer Agglutinationswirkung vollkommen. Ich immunisierte nämlich mit jedem Stamme je ein Kaninchen durch intravenöse Injektion lebender Agarkulturen und konnte dann feststellen, daß beide Kulturen von beiden Seris annähernd in denselben Verdünnungen beeinflußt wurden ($^{1}/_{4000}$). Die Identität beider Stämme steht somit außer allem Zweifel. Es scheint sich um einen Bacillus zu handeln, der nicht so selten im menschlichen Darme vorkommt, was um so wichtiger ist, als er in hohem Maße geeignet erscheint, bei Stuhluntersuchungen nach v. Drigalski und H. Conradi zu Täuschungen zu führen.

Die Ergebnisse der bisherigen Untersuchungen können wir folgendermaßen zusammenfassen:

Das typhusähnliche Wachstum auf dem v. Drigalski-Conradi'schen Nährboden und die Agglutination durch ein hochwertiges Ziegenimmunserum (1 : 10000) in 200- und selbst 1000-facher Verdünnung genügt nicht, um einen beweglichen Bacillus als Ba. typhi zu identifizieren.

Aber auch die weiterhin von v. Drigalski und Conradi angegebenen Unterscheidungsmittel: Nichtveränderung des Neutralrotagars und geringe Säurebildung in Lackmusmolke, reichen nicht aus, um die Typhusbacillennatur des betreffenden Spaltpilzes sicher festzustellen.

Müßten hiernach für eine einwandsfreie Diagnose sämtliche übrigen biologischen Eigenschaften, vor allem auch das Wachstum auf Gelatine, geprüft werden [1]), so würde einer der Hauptvorteile der ganzen Methode: die Raschheit in der Diagnose Einbuße erleiden.

Da scheint sich nun ein einfacher Ausweg zu bieten, den v. Drigalski und H. Conradi in nachstehender Weise andeuten: „Die Agglutinationsprobe wird um so zuverlässiger, je hochwertiger das Typhusimmunserum ist und je höher demnach der Verdünnungsgrad des Serums gewählt wird.“ Bei dieser Erwägung drängt sich von selbst die Frage auf, ob nicht durch die Anwendung sehr hoher, nur wenig unter dem Grenzwerte eines hochwertigen Immunserums stehender Verdünnungen jeglicher Fehler bei der Identifizierung typhusverdächtiger Spaltpilze ausgeschlossen werden könnte; Untersuchungen nach dieser Richtung müßten zum Ziele führen, einmal, wenn sämtliche Typhusstämme von einem Typhusimmunserum annähernd gleichstark beeinflußt werden, und zweitens, wenn das verwendete Typhusimmunserum jede Typhuskultur in stärkerer Verdünnung agglutiniert als irgend einen anderen Bakterienstamm.

Schon Gruber und Durham (6) hatten in ihrer Veröffentlichung über die Agglutination des Choleravibrio und Typhusbacillus darauf hingewiesen, daß zwar die Wirkung der Immunsera keine scharf spezifisch abgegrenzte sei, z. B. wurde das Ba. enteritidis Gärtner in völlig typischer Weise durch konzentriertes Serum agglutiniert. Aber bereits sie sprachen die Vermutung aus, daß sich die Serumprobe zu einem verläßlichen Unterscheidungsverfahren ausbilden lasse, wenn man die Quantitäten genauer berücksichtige. Dieser Gedanke wurde in der Folgezeit weiter ausgebaut. Zahlreiche Untersuchungen zeigten zunächst, daß das Serum eines mit einer Typhuskultur geimpften Tieres alle anderen Typhuskulturen in denselben Mengenverhältnissen agglutiniert

1) Vergl. P. Musehold, a. a. O. p. 589.

wie diejenige Kultur, mit der das Tier geimpft war. „Darin stimmen unsere Resultate", sagt Mauro Jatta (7), „mit denen von Bensaude und Achard (20 verschiedene Typhuskulturen), von Widal (26 Kulturen), Stern, Fraenkel und Förster überein. Alle diese Autoren bemerkten nur kleine Unterschiede in der Art des Verhaltens der verschiedenen Kulturen von Typhusbacillen, die sie angewendet hatten, gegenüber demselben Serum." Auf der Basis dieser Ergebnisse führten dann eingehende Untersuchungen [Beco (8), Mauro Jatta[1]), Sternberg (9)] über die Agglutination von Coli und coliähnlichen Bacillen durch Typhusimmunserum zu dem Satze, den L. Beco etwa folgendermaßen faßte: „Die Agglutination durch Typhusimmunserum ist ein sicheres und praktisches Mittel zur Identifizierung des Eberth'schen Bacillus, wenn man sich eines sehr hochwertigen Serums bedient. Die Diagnose darf nur dann positiv gestellt werden, wenn die Bacillen von bedeutend stärkeren Verdünnungen des Serums agglutiniert werden als die empfindlichsten Vertreter der Coli-Gruppe." Beco benutzte ein Serum, das 18 verschiedene Typhuskulturen noch in Verdünnungen von $^1/_{100000}$ beeinflußte, während es bei den drei empfindlichsten von den 36 untersuchten Coli-Stämmen mit einer 10000-fachen Verdünnung die Grenze seiner Wirksamkeit erreichte.

Wenden wir nun diesen Beco'schen Satz auf unsere 4 Stämme an: Wir sahen, daß diese von dem Ziegenimmunserum wohl noch in der Verdünnung von $^1/_{1000}$ agglutiniert wurden, daß aber schon eine Verdünnung von $^1/_{2000}$ unwirksam blieb, während der Typhusbacillus noch in einer 12000-fachen Verdünnung von dem Serum beeinflußt wurde; würden wir also an Stelle des 250- oder 1000-fach verdünnten Serums etwa eine 10000-fache Verdünnung bei der Identifizierung angewendet haben, so würde keine Agglutination eingetreten sein und die betreffenden Bakterien wären sofort als Nichttyphen erkannt worden.

Aehnliche Resultate lieferte die Prüfung der 4 Stämme mit 2 anderen Immunseris:

Da das anfangs verwendete Ziegenimmunserum infolge Infektion mit einer stark wuchernden Kokkenart zu weiterem Gebrauche sehr bald untauglich wurde, so wurde durch intravenöse Injektion lebender Agarkulturen ein Kaninchenimmunserum hergestellt, das seinen homologen Bacillus (Ta. R. G.) noch in 60000facher Verdünnung beeinflußte. Die Prüfung unserer 4 Stämme mit diesem Immunserum hatte folgendes Ergebnis[2]):

D. U.	St. 34	S. R.	B. R.
$^1/_{200}$ +	$^1/_{300}$ +	$^1/_{400}$ +	$^1/_{1500}$ +
$^1/_{400}$ —	$^1/_{400}$ —	$^1/_{600}$ —	$^1/_{2000}$ —

Diese Agglutinationsverhältnisse bestätigten die Vermutung v. Drigalski's und H. Conradi's nicht, daß sich das Ziegenimmunserum durch absolute Spezifität der agglutinierenden Wirkung gegenüber den Typhusbacillen vor dem Kaninchenimmunserum auszeichnet. Die 3 ersten

1) l. c.

2) In dieser wie in allen folgenden Tabellen verstehen wir unter positiv (+) die mikroskopisch im ganzen Gesichtsfelde beobachtete Entstehung zahlreicher Bacillenhäufchen von 5 und mehr Stäbchen, — im Laufe einer Stunde, bei Zimmertemperatur. Der Eintritt völliger Paralyse aller Bakterien, welcher von verschiedenen Seiten [Fischer (10), Kölzer (11)] verlangt wird, wurde für ein positives Ergebnis nicht als erforderlich erachtet; das gleichzeitig beobachtete Kontrollpräparat der Kulturaufschwemmung mußte unter denselben äußeren Bedingungen unverändert bleiben.

Stämme werden von dem hochwertigen Kaninchenimmunserum in geringerem Maße beeinflußt, als von dem nicht so aktiven Ziegenimmunserum. Nur der B. R. wird von dem ersteren in höherem Grade agglutiniert. Eine Erklärung für diese Thatsachen könnte man vielleicht in dem Umstande finden, daß schon normales Ziegenserum eine intensivere Wirkung auf die Stämme D. U., St. 34 und S. R. entfaltet, als normales Kaninchenserum, während es bei B. R. umgekehrt ist, wie aus folgenden 2 Tabellen hervorgeht.

a) Normales Ziegenserum.

D. U.	St. 34	S. R.	B. R.
1/80 + 1/80 —	1/60 + 1/80 —	1/60 + 1/80 —	1/40 + 1/60 —

b) Normales Kaninchenserum.

D. U.	St. 34	S. R.	B. R.
1/1 —	1/1 + 1/10 —	1/10 + 1/20 —	1/60 + 1/80 —

Durch die Liebenswürdigkeit des Herrn v. Drigalski, dem wir auch das erste Ziegenimmunserum verdanken, gelangten wir später wieder in den Besitz eines Ziegenimmunserums, das sich allerdings dem Ta. R. G. gegenüber nur noch in einer Verdünnung von 1/400 wirksam zeigte. Unsere 4 Stämme wurden von ihm in folgender Weise beeinflußt:

D. U.	St. 34	S. R.	B. R.
1/400 + 1/500 —	1/300 + 1/400 —	1/300 + 1/400 —	1/400 + 1/500 —

Der Beco'sche Satz behält somit auch gegenüber diesen Bacillenarten seine Giltigkeit — allerdings nur dann, wenn seine Voraussetzung richtig ist, daß ein hochwertiges Typhusimmunserum auf sämtliche Typhuskolonieen eine annähernd gleichstarke Wirkung ausübt.

Außer an dem Ta. R. G. wurde das Verhalten der beiden Immunsera zu drei weiteren authentischen Typhusstämmen geprüft. Der eine, Ta. R. O., wurde vor etwa 2 Jahren im hiesigen Laboratorium aus Roseolenblut gezüchtet, der zweite, Ta. U. R., etwa zu gleicher Zeit aus dem Urin eines Typhuskranken gewonnen, der dritte, Ta. G. K., wurde im November 1901 mittels des v. Drigalski-Conradi'schen Verfahrens in Gelsenkirchen aus Typhusstuhl gezüchtet und mit einem Immunserum identifiziert, dessen Grenzwert über 1/10000 lag.

Die 4 Typhusstämme verhielten sich den Immunseris gegenüber folgendermaßen:

a) Kaninchenimmunserum.

Ta. R. G.	Ta. R. O.	Ta. U. R.	Ta. G. K.
1/60000 + 1/80000 —	1/50000 + 1/60000 —	1/60000 + 1/80000 —	1/100 + 1/150 —

b) Ziegenimmunserum.

Ta. R. G.	Ta. R. O.	Ta. U. R.	Ta. G. K.
1/4000 + 1/5000 —	1/4000 + 1/5000 —	1/4000 + 1/5000 —	1/60 + 1/80 —

Die 3 ersten Stämme werden also, wie erwartet, von den Immunseris in gleichen oder wenigstens annähernd gleichen Verdünnungen agglutiniert.

Ganz auffallend nach allen bisherigen Erfahrungen aber ist die außerordentlich geringe Beeinflussung des Stammes Ta. G. K. durch beide Sera.

Der Stamm wurde mit den Blutseris Typhuskranker zusammengebracht, von denen das eine den Ta. R. G. in 300-, das zweite in 100-, das dritte in 80-facher Verdünnung agglutinierte. Der Ta. G. K. wurde nur von dem ersten in 20facher Verdünnung beeinflußt, die beiden anderen versagten selbst in der Verdünnung von $^1/_{10}$. — Also auch hier ein ähnliches Verhalten wie gegenüber den tierischen Immunseris.

Schließlich wurde ein Kaninchen mit diesem Stamme durch intravenöse Injektionen lebender Bacillen immunisiert, und zwar erhielt das Tier zuletzt drei 48-stündige in Bouillon aufgeschwemmte Agarkulturen. Sein Serum zeigte darauf folgende Einwirkung auf die 4 Typhusstämme:

Ta. R. G.	Ta. R. O.	Ta. U. R.	Ta. G. K.
$^1/_{20000}$ + $^1/_{30000}$ —	$^1/_{20000}$ + $^1/_{30000}$ —	$^1/_{20000}$ + $^1/_{40000}$ —	$^1/_{4000}$ + $^1/_{5000}$ —

Also selbst von seinem homologen Immunserum wird der Stamm Ta. G. K. in bedeutend geringerem Maße beeinflußt als die übrigen Typhusstämme.

An der echten Typhusnatur desselben ist kein Zweifel. Sie wurde sofort nach den Ergebnissen der ersten Agglutinationsversuche nachgeprüft und dabei insbesondere eine Verwechslung mit dem Ba. faecale alcaligenes Petruschky ausgeschlossen. Der Stamm Ta. G. K. rief in Lackmusmolke konstant geringe Säurung hervor und wuchs auf derselben Kartoffel genau so wie der Ta. R. G. Ein Alcaligenes-Immunserum würde wohl ferner gegenüber echten Typhusstämmen kaum ein so hohes Agglutinationsvermögen entfaltet haben.

Und schließlich der sicherste Beweis dafür, daß der Ta. G. K. ein pathogener Eberth'scher Bacillus ist: Ich infizierte mich am 1. Juni d. J. gelegentlich der letzten intravenösen Injektion des immunisierten Kaninchens mit dem Stamme; das Tier zuckte gerade in dem Augenblicke, als die zu injizierende Flüssigkeit unter ziemlich hohem Drucke stand, unerwartet zurück, so daß die schräge Oeffnung der Kanüle teilweise aus der Ohrvene herausglitt, und mir ein Sprühregen der Kulturaufschwemmung direkt in das Gesicht spritzte; trotz sofortiger sorgfältiger Desinfektion erkrankte ich 3 Wochen später an Typhus. Die klinischen Erscheinungen bestanden in 8 Tage lang anhaltendem Fieber (—39,0°), Stuhlverstopfung, Meteorismus mit Ileocöcalgurren, in dem Auftreten von einzelnen Roseolen und der Diazoreaktion im Urin. Mein Serum agglutinierte am 6. Tage den Ta. R. G. lebhaft in 300facher Verdünnung, den homologen Stamm Ta. G. K. dagegen in der Verdünnung von $^1/_{100}$ nur noch schwach, wie Herr Oberstabsarzt Musehold feststellte. O.-St.-A. M. vermochte leider bei dem abortiven Verlaufe der Erkrankung und bei der Dringlichkeit anderweitiger Beschäftigung nicht, den Bacillus aus dem Stuhle oder Urin zu isolieren; dies glückte ihm jedoch in einem zweiten Falle von Laboratoriumsinfektion durch denselben Bacillus: der in dem Laboratorium beschäftigte Sanitätsgefreite C. erkrankte etwa 14 Tage nach mir ebenfalls an Typhus; der Gedanke, daß er sich bei derselben Gelegenheit, wie ich, angesteckt hat, ist nicht von der Hand zu weisen, da er damals das Versuchstier hielt und zum Teil demselben Sprühregen von Typhusbacillen ausgesetzt war. Allerdings

wäre die Inkubationszeit dann eine außergewöhnlich lange. Die Erkrankung des S.-G. C. war klinisch charakterisiert durch ein 12-tägiges Fieber (—39,9°), heftige Kopfschmerzen, leichte Bronchitis, Stuhlverstopfung, Milzschwellung und zahlreiche deutliche Roseolen. Aus einer frisch entstandenen Roseole züchtete Herr O.-St.-A. Musehold in Bouillon unmittelbar in Reinkultur einen Bacillus (Ta. C. O.), der in seinen morphologischen und kulturellen Eigenschaften völlig dem Typhusbacillus gleicht, von unserem Ziegenimmunserum jedoch nur in der Verdünnung von $^1/_{20}$ und von dem (mit dem Ta. R. G. gewonnenen) Kaninchenimmunserum in der Verdünnung von $^1/_{150}$ beeinflußt wird. Auf das eigene Serum des Kranken, das den Ta. R. G. noch in 100facher Verdünnung prompt agglutinierte, reagiert der Stamm gar nicht, ebensowenig auf das Serum eines anderen Typhuskranken mit positivem Widal ($^1/_{100}$). Mein eigenes, etwa $2^1/_2$ Wochen altes, aufbewahrtes Serum verursachte in 10facher Verdünnung noch deutliche Häufchenbildung. — Dagegen wurde der Stamm Ta. C. O. von dem Immunserum des Stammes Ta. G. K. noch in 20000facher Verdünnung agglutiniert, und damit der Beweis erbracht, daß der Ta. G. K. auch in dem letzten Falle der infizierende Spaltpilz gewesen ist.

Es fehlt eine Erklärung dafür, warum der Stamm nach seiner Passage durch den menschlichen Körper und die dadurch bedingte Erhöhung seiner Virulenz von seinem Immunserum stärker beeinflußt wurde, als vorher. Man hätte eher das Gegenteil erwartet; Kolle und Gruber bringen die geringe Agglutinabilität eines Stammes mit seiner hohen Virulenz in Verbindung; nach K. steht die Agglutination eines Serums mit Typhusbacillen in umgekehrtem Verhältnis zu der Virulenz der Bacillen, und Gruber rät, für die Diagnostik des Serums eine Kultur von wenig virulenten Typhusbacillen zu nehmen, weil sie empfindlicher wäre, und meint ferner, vermittels eines Serums, dessen Agglutinationsvermögen genau bestimmt sei, über die Virulenz einer Kultur urteilen zu können [1]). Für die hohe Virulenz des Ta. G. K. spricht schon seine Abstammung von der ausgedehnten Gelsenkirchener Epidemie, ferner die hochgradige Infektiosität, die er noch nach $^1/_2$-jähriger Züchtung auf künstlichen Nährböden im hiesigen Laboratorium gegenüber 2 Personen, die mit ihm in Berührung kamen, entfaltete, und schließlich der Tierversuch: ich impfte 3 Meerschweinchen von 400, 405 und 330 g Gewicht intraperitoneal und zwar mit je 1,5 mg einer 24-stündigen Agarkultur der Stämme Ta. R. G., Ta. G. K. und Ta. C. O., also mit der Hälfte der von Lösener [2]) angegebenen Dosis letalis. Während das erste Tier kaum erkrankte, ging das zweite nach $13^1/_2$, das dritte nach 12 Stunden zu Grunde. Bei der Sektion fand sich eine serös-fibrinöse Bauchfellentzündung, und die Spaltpilze konnten aus sämtlichen Organen gezüchtet werden.

Schließlich bleibe eine Beobachtung nicht unerwähnt: Es ist anzunehmen, daß der Stamm Ta. G. K. von unserem hochwertigen (mit dem Ta. R. G. gewonnenen) Kaninchenimmunserum kurz nach dessen Entnahme aus dem Tierkörper in stärkerem Grade agglutiniert wurde, als es bei den hier niedergelegten, fast 5 Monate später vorgenommenen Versuchen der Fall war, denn in den Aufzeichnungen von Ende Januar 1902 findet sich die Notiz, daß der Grenzwert für den Ta. G. K. bei

1) Citiert von Mauro Jatta l. c.
2) Nach Kruse in Flügge's Mikroorganismen. 1896. II. Teil. p. 387.

$^{1}/_{5000}$ lag. Es würde dann eine außerordentlich schnelle und starke Abnahme des Agglutinationsvermögens gegenüber dem Stamme stattgefunden haben, während das Verhalten des Immunserums den anderen 3 Typhusstämmen gegenüber nach den 5 Monaten keine Aenderung zeigte. Unsere wesentlichsten Resultate vermag dieser Umstand nicht zu beeinflussen.

Die bei dem Ta. G. K. gemachte Beobachtung, daß es Typhusstämme giebt, die sich durch eine verhältnismäßig schwere Agglutinabilität gegenüber den mit den gewöhnlichen Eberth'schen Bacillen gewonnenen Immunseris und auch gegenüber den Seris Typhuskranker auszeichnen, berechtigt uns, zu den oben zusammengefaßten Untersuchungsergebnissen nachstehende Sätze hinzuzufügen:

1) Die Gruber-Widal'sche Reaktion ist nur mit solchen Typhuskulturen vorzunehmen, deren Agglutinabilität genau geprüft und bewährt ist[1]).

2) Man kann wohl ohne Irrtum Spaltpilze, die von einem hochwertigen Immunserum annähernd gleich stark beeinflußt werden, wie der homologe Typhusstamm, für echte Eberth'sche Bacillen erklären, aber man ist nicht berechtigt, die Bakterien, welche weit hinter dem Grenzwerte dieses Serums zurückbleiben, für keine Typhusbacillen zu erachten. Der Beco'sche Satz erweist sich also als nicht für alle Fälle entscheidend.

Der Vergleich der Agglutinationsverhältnisse des Stammes Ta. G. K. mit denen der Stämme D. U., St. 34, S. R. und B. R. ergiebt, daß gewisse Typhuskulturen von einem hochwertigen Typhusimmunserum sogar weniger intensiv beeinflußt werden können als andere Bakterienarten[2]).

So haben denn unsere Versuche, durch Anwendung stärkerer Verdünnungen hochwertigerer Immunsera bei der Identifizierung verdächtiger Kolonieen den Typhusbacillennachweis mittels der v. Drigalski-Conradi'schen Methode sicherer zu gestalten, nicht zum gewünschten Ziele geführt. Wir wenden jetzt neben dem Ziegenimmunserum auch noch das Ta. G. K.-Immunserum bei der Untersuchung typhusähnlicher Kolonieen an und prüfen bei verdächtigen Kulturen erst sämtliche biologischen Eigenschaften, bevor wir eine bestimmte Diagnose stellen; hierdurch wird das Verfahren des Typhusbacillennachweises verlängert, die Beurteilung der isolierten Stämme jedoch eine auf breiterer Grundlage ruhende. Ob derartige Weiterungen der Untersuchung im Rahmen geschlossener Epidemieen ohne wesentliche Fehlerquellen fallen gelassen werden dürfen, müssen die im Großen gewonnenen Erfahrungen ergeben — wie sie z. B. gegenwärtig in so reichem Maße von den von R. Koch geleiteten Typhuskommissionen gesammelt werden.

Zum Schlusse sage ich Herrn Oberstabsarzt Musehold für die Anregung zu vorliegenden Untersuchungen und für die ausgiebige Beratung und Unterstützung bei der Ausführung derselben meinen gehorsamsten Dank.

---

1) Dieser Satz ist bereits von P. Musehold, a. a. O. p. 586, aufgestellt.

2) Dieser Satz findet in der während der Drucklegung dieser Arbeit in der Zeitschrift f. Hyg. u. Infektionskrankh. Bd. XL. p. 522 erschienenen Arbeit Hünermann's: „Bakteriologische Befunde bei einer Typhusepidemie“ weitere Stützpunkte.

Benutzte Litteratur.

1) v. Drigalski u. Conradi, H., Ueber ein Verfahren zum Nachweis der Typhusbacillen. (Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. Bd. XXXIX.)
2) Musehold, P., Zur Bekämpfung des Typhus. (Vierteljahrschr. f. öffentliche Gesundheitspflege. 1902. Augustheft; ferner: Dtsch. militärärztl. Zeitschr. Aprilheft. 1902. p. 231.)
3) Rothberger, S., J., Differentialdiagnostische Untersuchungen mit gefärbten Nährböden. (Centralbl. f. Bakt. Bd. XXIV u. XXV.)
4) Scheffler, Das Neutralrot als Hilfsmittel zur Diagnose des Bacterium coli. (Ebenda. Bd. XXVIII. p. 199.)
5) Kayser, H., Das Wachstum der zwischen Bacterium typhi und coli stehenden Spaltpilze auf dem v. Drigalski-Conradi'schen Agarboden. (Ebenda. Bd. XXXI.)
6) Gruber und Durham, Eine neue Methode zur raschen Erkennung des Choleravibrio und Typhusbacillus. (Münchener mediz. Wochenschr. 1896. No. 13.)
7) Mauro Jatta, Experimentelle Untersuchungen über die Agglutination des Typhusbacillus und der Mikroorganismen der Coligruppe. (Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankheiten. Bd. XXXIII.)
8) Beco, L., Note sur la valeur de l'agglutination par le sérum antityphique expérimental comme moyen de diagnostic entre le bacille d'Eberth et les races coliformes. (Centralbl. f. Bakt. Bd. XXVI.)
9) Sternberg, C., Zur Verwertbarkeit der Agglutination für die Diagnose der Typhusbacillen. (Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. Bd. XXXIV.)
10) Fischer, Al., Welchen praktischen Wert hat die Widal'sche Reaktion? (Ebenda. Bd. XXXII.)
11) Kölzer, W., Weitere Betrachtung über die „Widal'sche Reaktion" bei Abdominaltyphus. (Ebenda. Bd. XXXVI.)

Zur quantitativen Bestimmung der Wasserkeime.

[Aus dem bakteriologischen Institut im anorg.-chemischen Laboratorium der technischen Hochschule zu Dresden.]

Von Bezirksarzt Dr. **W. Hesse** in Dresden.

In No. 29 der Zeitschrift für Hygiene und Infektionskrankheiten, Bd. XXIX. 1898, haben Niedner und ich ein Verfahren zur bakteriologischen Untersuchung des Wassers vorgeschlagen, bei dessen Anwendung man zu folgenden Schlüssen gelangt:

1) Zu Wasseruntersuchungen eignet sich ein einfacher, nur aus 1 Teil Nährstoff Heyden, 1 Teil Agar Agar und 98 Teilen destillierten Wasser bestehender Nährboden besser als jeder andere, weil in ihm durchschnittlich 10 bis 20mal soviel Kolonieen auswachsen als in der gebräuchlichen Nährgelatine, und — abgesehen vom Ausbleiben von Peptonisierung — nach keiner Richtung Mängel auftreten.

2) Dieser Nährboden ist seiner leichten und allerwärts gleichen Herstellbarkeit wegen geeignet, die überall damit gewonnenen Ergebnisse untereinander zu vergleichen.

3) Die Gepflogenheit, die Kolonieen bereits nach Ablauf weniger Tage zu zählen und die erhaltenen Zahlen wissenschaftlich zu verwerten, ist unhaltbar, seitdem es ein Verfahren giebt, das gestattet, abzuwarten, bis sämtliche im Nährboden wachsenden Keime sich zu Kolonieen entwickelt haben, was in der Regel binnen 9—10 Tagen geschieht.

Unser Vorschlag hat eine sehr verschiedene Beurteilung erfahren. Die Vorzüge derselben sind aber neuerdings von sehr beachtlicher

Seite voll bestätigt und gewürdigt worden, und zwar zuletzt von dem Bakteriologen der Experiment Station zu Lawrence, Mass., Gage, und dessen Mitarbeiter Phelps[1]).

In der Erwartung, daß die Veröffentlichung der genannten Herren unverkürzt in deutscher Sprache wiedergegeben werden wird, entnehme ich derselben nur zwei Uebersichten, die die Ueberlegenheit unserer Methode besonders deutlich darthun.

Die erste Uebersicht drückt in Prozenten aus, wieviel Kolonieen sich bei täglichen Zählungen in verschiedenen Nährböden entwickelten (jede Zahl ist das Mittel aus 4 Beobachtungen).

Erste Uebersicht.

Nährböden[2])	Tage							
	2	3	4	5	6	7	8	9
Nährstoff Heyden-Agar Agar	19	60	78	85	95	99	99	100
Nährstoff Heyden-Pepton-Agar Agar	10	22	26	28	30	30	30	30
Pepton-Agar Agar	11	16	22	23	24	24	24	24
Fleisch-Agar Agar	8	13	16	17	17	17	17	17
bloß Agar-Agar	8	10	13	14	14	14	14	14
gewöhnlicher (regular) Agar Agar[3])	7	9	11	11	11	11	11	11
Nährstoff Heyden-Glycerin-Agar Agar	6	10	11	11	11	11	11	11
Nährstoff Heyden-Fleisch-Agar Agar	7	7	8	8	10	10	10	10
Fleisch-Gelatine	12	19	24	26	26	26	26	26
Pepton-Gelatine	7	12	18	20	20	20	20	20
Normal- (Standard-) Gelatine	8	10	11	12	13	13	13	13
bloß Gelatine	1	6	12	13	13	13	13	13
Nährstoff Heyden-Gelatine	5	6	9	11	13	13	13	13

Die zweite Uebersicht zeigt in Prozenten den Unterschied in der Zahl der in gewöhnlichem Nähr-Agar Agar und unserem Agar Agar zur Entwickelung gekommenen Kolonieen bei Verwendung von Wasser verschiedener Herkunft.

Zweite Uebersicht.

gewöhnlicher (regular) Agar Agar							
	Tage						
	2	3	4	5	6	7	8
Grundwasser	6	5	6	6	6	6	6
Filtriertes Wasser	6	7	7	7	7	7	7
Merrimack-Flußwasser	6	7	7	8	8	9	9
Filtriertes Kanalwasser	14	17	18	19	19	19	19
Kanalwasser	34	44	46	46	46	46	46

1) Studies of media for the quantitative estimation of bacteria in water and sewage. (Abdruck aus den Verhandlungen der 29. im September 1901 zu Buffalo abgehaltenen Jahresversammlung der American Public Health Association.)

2) Abgesehen von den Nährstoff Heyden enthaltenden, waren die Nährböden nach dem von Fuller und Copeland in the 1895 report of the Massachusetts Board of Health beschriebenen Verfahren hergestellt..

3) 1 Teil Agar Agar, 1 Teil Pepton, 3 Teile Glycerin, 95 Teile Fleischbrühe.

Nährstoff Heyden-Agar Agar

Grundwasser	6	43	78	88	93	100	100
Filtriertes Wasser	37	69	80	92	98	100	100
Merrimack-Flußwasser	29	78	93	97	97	99	100
Filtriertes Kanalwasser	26	65	93	95	97	99	100
Kanalwasser	39	75	95	100	100	100	100

Einige Bemerkungen über die Färbung der Geisseln, besonders über das Verfahren von van Ermengem.

Von **W. Kuntze**, Leipzig-Leutzsch.

Mit 1 Figur.

So wichtig und unerläßlich es, namentlich bei der Entscheidung systematischer Fragen ist, Zahl und Anordnung der Geißeln bei den betreffenden Bakterien mit Sicherheit festzustellen, so wenig sind doch die für diesen Zweck gebräuchlichen Verfahren geeignet, die eben angedeutete Aufgabe besonders leicht und einfach zu gestalten. Noch immer ist vielmehr der Nachweis der Geißeln mit mehr oder minder erheblichen Schwierigkeiten verknüpft, die natürlich dem Anfänger weit stärker entgegentreten als dem Geübten, indessen auch dem letzteren nicht erspart bleiben, und in eine jede der empfohlenen Methoden muß man sich deshalb erst gewissermaßen einarbeiten, ehe sie brauchbare Ergebnisse liefert.

Ich habe mich nun längere Zeit mit den verschiedenen hierher gehörigen Verfahren beschäftigt, von dem ursprünglichen Loeffler'schen bis zu dem recht verwickelten, von Zettnow herrührenden und bin dabei schließlich zu der Ueberzeugung gelangt, daß zwar die Zettnow'sche Methode an sich das Höchste leistet, die Loeffler'sche namentlich in der Hand des Anfängers häufig versagt, daß aber eben für diesen die von van Ermengem beschriebene immer noch als die sicherste bezeichnet werden muß und die durchschnittlich besten Resultate ermöglicht. Im folgenden sollen daher ganz kurz einige kleine Winke zur bequemeren und schnelleren Ausführung gerade des van Ermengem'schen Verfahrens[1]) gegeben werden, und es mag das um so eher angebracht erscheinen, als der seiner Zeit in diesem Blatte[2]) ausgesprochene Wunsch nach Vereinfachung der Methode bislang noch keine Beachtung gefunden hat. So hat z. B. wohl auch Hinterberger[3]), dessen treffliche Mitteilungen ich mir sonst bei meinen Untersuchungen zu Nutze gemacht habe, durch seine komplizierte Schilderung von weiteren Schritten auf diesem Wege eher abgeschreckt als zu neuen Anläufen ermutigt.

Der Gang der von mir angewandten Technik läßt sich kurz etwa folgendermaßen schildern:

Als Nährboden für die Züchtung der Bakterien empfiehlt sich am meisten das gewöhnliche 1-proz. Fleischwasserpeptonagar, jedoch ohne Zusatz von Kochsalz. Die Röhrchen brauchen nicht ganz frisch

1) Centralbl. f. Bakt. etc. Bd. XV. p. 969. Ref. Czaplewski.
2) Loc. cit.
3) Centralbl. f. Bakt. etc. Abt. I. Bd. XXVII. p. 597.

zu sein, liefern vielmehr selbst nach 4 Wochen noch geeignetes Material (vergl. Migula, System der Bakterien. Bd. I. p. 107). Zur Abimpfung benutzt man am besten mehrere Tage bis Wochen alte Kulturen, die vorher einige Zeit bei Zimmertemperatur aufbewahrt worden sind, während die frisch angelegten Röhrchen bei Brütwärme gezüchtet werden und im Alter von 8—10 Stunden zur Verwendung gelangen. Dem Anschein nach übt gerade der so bewirkte Temperaturwechsel einen günstigen Einfluß auf die Färbbarkeit der Geißeln aus, so daß letztere dadurch dicker und kräftiger werden, während die längere Zeit bei dauernd dem gleichen Wärmegrade gezüchteten Kulturen Geißeln tragen, die äußerst empfindlich gegen alle Veränderung in der umgebenden Temperatur sind, wie solche sich ja natürlich bei der Herstellung der Präparate nicht vermeiden lassen. Ich komme später noch einmal auf diesen Punkt zurück.

Von ganz besonderer Bedeutung für den schließlichen Erfolg ist bekanntlich eine recht sorgfältige Behandlung und Vorbereitung der Deckgläser. Sofern sie vorher noch nicht benutzt worden sind, können sie einfach sauber abgewischt und mehrmals mit Aether gespült werden, worauf letzterer in der Bunsenflamme abgebrannt wird. Weit bessere und zuverlässigere Ergebnisse aber erzielt man ohne Frage, wenn man sich an die Vorschriften von van Ermengem und Hinterberger hält und also folgendermaßen verfährt.

Die neuen Deckgläschen werden mit einem reinen, weichen Leinen- oder Baumwollentuche sauber abgewischt, an den Kanten angefaßt, ohne die Fläche zu berühren und einzeln in ein Becherglas geworfen, in dem sich eine Mischung von gleichen Teilen einer 6-proz. filtrierten Kaliumbichromatlösung und officineller Schwefelsäure befindet. Das Gefäß ist mehrfach zu bewegen, um das Zusammenbacken der Deckgläschen zu verhindern. Dann wird es vorsichtig erwärmt, die Flüssigkeit wiederholt aufgekocht, abgegossen und nun so lange mit destilliertem Wasser nachgespült, bis jede Spur einer gelben Färbung auch gegen ein untergelegtes weißes Blatt Papier verschwunden ist. Häufiges Umrühren mit einem ausgeglühten Platindraht oder einem in der Flüssigkeit miterhitzten Glasstab ist hierzu erforderlich. Das Wasser wird dann durch Spiritus vini, dieser durch Alcohol absolutus ersetzt und schließlich noch 2—3mal mit Aether nachbehandelt. Mit dem letzten Aether werden die Gläschen, die bei der ganzen Prozedur nicht trocken werden dürfen, in eine weithalsige, gut verschließbare, auf gleiche Weise gereinigte Flasche geschüttet und in dieser unter Aether bis zum Gebrauch aufbewahrt. Sollen sie benutzt werden, so muß man zuerst den Aether durch Erwärmung entfernen, wobei einige Vorsicht geboten, damit die Gläschen nicht springen; man zieht sie deshalb einzeln mit einer geglühten Pincette aus der Flüssigkeit heraus, faßt sie schnell mit einer Cornet'schen Pincette, bewegt sie kurze Zeit in der Flamme eines Bunsenbrenners hin und her, bis der Aether völlig verdunstet ist, ohne daß er aber anfangen darf zu brennen, erhitzt sie dann im oberen Teile der Flamme und läßt sie endlich ganz langsam abkühlen, indem man sie aus der Flamme emporhebt. Die so gebrauchsfertigen Deckgläschen stellt man nun mit der zur Aufnahme der Schicht bestimmten Seite nach unten in der Cornet'schen Pincette auf, um jede Ablagerung von Staub u. s. w. zu verhüten.

Zur Herstellung der Präparate bedient man sich zweier Platinnadeln, einer gewöhnlichen und einer etwa 3 cm langen, die im rechten Winkel zum Glasstab umgebogen ist und an ihrem Ende eine

Oese von $^1/_2$—$^3/_4$ mm Durchmesser trägt. Man bringt dann zunächst auf eines der Deckgläser einen Tropfen Brunnen- oder Leitungswasser als Vorratslösung und von hier aus mit der Oese einen etwa stecknadelkopfgroßen Tropfen auf ein zweites Deckglas. In diesen letzteren wird jetzt mit der Nadel eine möglichst geringe Menge des Bakterienrasens übertragen und nun mit Hilfe der Oese sofort ausgestrichen, jedoch ohne Reiben und Drücken, um nicht etwa die Geißeln abzureißen. Das Wasser soll dabei unter der Nadel verdunsten und das Deckglas also in wenigen Sekunden trocken sein. Zu dem ganzen Geschäft gehört nun allerdings eine gewisse Uebung. Namentlich darf die Menge des Materials weder zu groß noch zu gering sein, aber auch die Quantität des Wassers eine bestimmte Grenze nicht übersteigen, damit die Trocknung nicht verzögert wird. Je schneller diese letztere statt hat, um so leichter erfolgt die Fixierung der Geißeln, und es mag gleich hier hervorgehoben werden, daß es im allgemeinen viel schwieriger ist, die Geißeln in der gehörigen Weise zu fixieren, für die weitere Behandlung vorzubereiten, als zu färben.

Verschiedentlich ist für diesen Zweck ja empfohlen worden, es nicht bei einer Verdünnung zu belassen, sondern noch eine zweite oder gar dritte auf entsprechenden Deckgläsern vorzunehmen. Indessen kann man darauf im allgemeinen verzichten, besonders wenn zunächst nur festgestellt werden soll, ob Geißeln überhaupt und wie viele vorhanden sind. Will man trotzdem den umständlicheren Weg einschlagen, so verfährt man am besten so, daß man gleich auf dem ersten Gläschen neben dem großen Vorratstropfen noch einen kleinen, stecknadelkopfgroßen zweiten anlegt, diesen mit der Nadel beimpft und nun hiervon mit der Oese eine Spur in ein zweites Wassertröpfchen überträgt, das auf einem anderen Deckgläschen seinen Platz hat und sofort ausgestrichen wird.

Wie besonders A. Fischer[1]) hervorgehoben hat, werden die Geißeln durch eine Aenderung der Salzkonzentration in der umgebenden Flüssigkeit stark angegriffen, abgerissen oder aufgelöst. Von mindestens derselben Bedeutung aber ist, wie schon vorher kurz bemerkt, der Einfluß der Temperatur. Das geht z. B. aus folgender Beobachtung hervor. Eine etwa 1 Monat alte, im kalten Zimmer aufbewahrte Kultur des Heubacillus wurde auf Bouillon übertragen und dieses Röhrchen A 9 Stunden bei Brütwärme gehalten. Es zeigten sich jetzt im hängenden Tropfen reichliche, lebhaft schwärmende Stäbchen. Nun setzte ich einen Tropfen 11° warmen Leitungswassers hinzu; aber obwohl jetzt die Konzentration der Flüssigkeit auf die Hälfte verringert war, blieb die Beweglichkeit doch die nämliche. Zugleich aber wurde nun von A ein neues Bouillonröhrchen B beschickt und dieses nach 12-stündiger Aufbewahrung im Brütschrank ebenfalls untersucht. Während sich dabei von neuem lebhaft bewegliche Stäbchen nachweisen ließen, wurde die Lokomotion fast plötzlich verlangsamt und aufgehoben, als jetzt der Zusatz mit kaltem Wasser wiederholt wurde. Die Empfindlichkeit der seit etwas längerer Zeit bei Brütwärme gehaltenen Mikroorganismen gegen eine Erniedrigung der Temperatur hatte also eine erhebliche Steigerung erfahren, wobei es freilich noch dahingestellt bleiben mag, ob es sich um eine Kältestarre oder um

1) Pringsheim's Jahrbücher f. wissenschaftl. Botanik. Bd. XXVII. 1895. p. 1. Vergl. auch Migula, System der Bakterien. Bd. I. p. 133.

einen wirklichen Verlust an Geißeln, um eine Auflösung dieser Gebilde gehandelt hat.

Aus alledem geht jedenfalls hervor, daß die Anfertigung der Ausstrichpräparate mit großer Schnelligkeit und Vorsicht geschehen muß. Die eigentliche Fixierung selbst erfolgt dann in der bekannten Weise, indem man die Deckgläschen einige Male durch die Bunsenflamme zieht. Auch dabei muß freilich die richtige Mitte getroffen und innegehalten werden, was bis zu einem gewissen Grade Sache der Uebung ist. Günther-Johne[1]) lassen die Präparate während 3 Sekunden 3mal einen vertikalen Kreis von etwa 1 Fuß Durchmesser in bezw. über der Bunsenflamme beschreiben. Ich habe die Gläschen während derselben Zeit 4- auch 5mal durch die Flammen gezogen, ohne daß ich behaupten will, damit bessere Ergebnisse erzielt zu haben.

Sind die Präparate abgekühlt, so erfolgt die Behandlung mit der Beize. Die Ermengem'sche Flüssigkeit — 1 Vol. 2-proz. Osmiumsäure und 2 Vol. 25-proz. Tanninlösung (hergestellt aus Acid. tann. puriss. leviss. in destilliertem Wasser unter Erwärmung) mit 4 Tropfen Eisessig auf 100 ccm — soll beim Gebrauch mehrere Tage, besser noch etwa 1 Woche, alt sein. Sie wird in ein Uhrschälchen ausgegossen und nun das Deckglas, jedes für sich in einem besonderen Schälchen, mit der Schichtseite nach oben hineingeworfen, so daß es völlig von der Flüssigkeit bedeckt ist. Gelingt das nicht ohne weiteres, so muß man mit einem Glasstäbchen nachhelfen, wobei natürlich die bestrichene Fläche nicht berührt werden darf. Die Beize auf das Deckglas auftraufeln zu lassen und letzteres dabei in eine Pincette einzuklemmen, empfiehlt sich weniger, da die Beize dann am Rande immer ein wenig eintrocknet und die spätere Reinigung auf Schwierigkeiten stößt. In der Beize bleiben die Präparate je nach der Temperatur des betreffenden Raumes $^{1}/_{2}$—$^{3}/_{4}$ Stunde.

Alsdann wird das Deckglas mit dem Glasstab an den Rand des Uhrschälchens geschoben und hier sofort mit der Cornet'schen Pincette gefaßt. In dieser verbleibt es nun während der sämtlichen folgenden Akte. Notwendig ist es freilich, wenn man tadellose Präparate gewinnen will, bei der Färbung mit Gold- oder Silbersalzen jegliche Berührung des Deckgläschens mit Metallgegenständen zu vermeiden und also eine Pincette mit Glasspitzen zu benutzen, wie sie O. Preßler in Leipzig, Brüderstraße, nach Angabe des Verf.'s angefertigt hat und für M. 2 in den Handel bringt (s. Fig.).



Die nun folgende eigentliche Färbung ist schneller ausgeführt als beschrieben und zerfällt in 5 einzelne Abschnitte.

1) Sorgfältiges Abspülen des Deckglases mit destilliertem Wasser unter ganz sanftem Strahl der Spritzflasche, so daß das Wasser gerade tropft, da sonst doch unter Umständen noch Bakterien und Geißeln abgeschwemmt werden können. Auch die Rückseite muß in gleicher

1) Einführung in das Studium der Bakteriologie. 5. Aufl. p. 85.

Weise behandelt werden. Das Wasser soll ablaufen, aber nicht verdunsten.

2) Auf das noch feuchte Präparat giebt man aus einer Tropfflasche eine 1-proz. alkoholische Silbernitratlösung (90—96-proz. Alkohol) und läßt sie mehrere Sekunden einwirken. Durch leichte Bewegungen mit der Pincette wird die Flüssigkeit über das ganze Deckglas verteilt.

3) Mit einer Pipette oder Glasröhre bringt man nun den Entwickler (5 g Acid. gall., 3 g Tannin, 10 g Natr. acet. fus., 350 g Aq. dest.) herauf und zwar mit einem Schuß, so daß das Deckglas sofort bedeckt ist. Nach ganz kurzer Einwirkung läßt man ablaufen und benutzt

4) zum zweiten Male die alkoholische Silberlösung. Es entstehen sofort Wolken eines schwarzen Niederschlages, die man nach 2—3 Sekunden durch weiteren Zusatz des Silbernitrats wegschwemmt. Ist das geschehen, so erfolgt schließlich

5) Abspülen mit destilliertem Wasser. Ist das Präparat jetzt sauber und frei von Niederschlägen, so kann man es alsbald mit absolutem Alkohol behandeln und durch leichte Bewegung hoch über der Bunsenflamme rasch trocknen. Nur die bestrichenen Stellen dürfen alsdann noch gefärbt erscheinen, während die ganze Umgebung, namentlich auch die Ränder völlig blank und ohne alle Farbstoffreste erscheinen müssen.

Ist das nicht der Fall, sind also noch Niederschläge vorhanden, wie das stets zu geschehen pflegt, wenn zuviel Material auf dem Deckglase ausgebreitet ist oder die benutzten Lösungen nicht rasch und gleichmäßig verteilt worden sind, so kann man

6) noch eine Nachbehandlung und Klärung mit Goldchlorid 1 : 2000—1 : 3000 vornehmen.

Indessen empfiehlt es sich dann, das Präparat vorher einige Zeit dem hellen Tageslicht auszusetzen, da sonst die Bakterien zu stark durch das Chlorgold entfärbt werden und nur noch die Geißeln gefärbt bleiben. In jedem Falle aber darf die Goldlösung nur ganz kurz einwirken und muß nachher auf das sorgfältigste wieder entfernt werden. Sollen die Geißeln dann die gewünschte Färbung zeigen, so ist es außerdem zweckmäßig, die Präparate einige Tage hindurch am Lichte liegen zu lassen, da die Reduktion des Goldes viel langsamer erfolgt, als die des Silbers.

Hinterberger hat an Stelle des Goldchlorids zur Beseitigung der Niederschläge die Behandlung mit einer 7-promill. Kochsalzlösung und Abspülen mit verdünntem Ammoniak (Liq. ammon. 1 : 4—5) benutzt. Dieses Verfahren leistet auch an sich vorzügliches, aber die Präparate sind oft nicht recht haltbar und verblassen, wohl unter dem Einfluß des Ammoniaks, schon nach kurzer Zeit.

Der ganze Prozeß ist ein photochemischer und gelingt am besten bei hellem Tageslicht. Die Vorgänge erinnern an die beim Albuminsilberpositivverfahren[1]) bekannten. Die Bakterien und die Geißeln binden das Silbersalz und letzteres schwärzt sich dann unter dem Einfluß des Lichtes oder kann nachher durch Entwickelung reduziert werden. Das überschüssige und nicht fixierte Silber dagegen wird mechanisch durch Spülen mit Wasser oder chemisch durch Auflösen entfernt.

---

1) Schmidt, Compendium der Photographie. 5. Aufl. p. 268.

Werden alle diese Punkte in gehöriger Weise berücksichtigt, so gelingt es selbst dem Anfänger, ausgezeichnete Präparate zu erzielen, und es mag schließlich nur noch betont werden, daß das ganze Verfahren, so umständlich es vielleicht nach der Beschreibung erscheinen mag, doch kaum wesentlich mühevoller und zeitraubender ist, als z. B. die Färbung von Schnitten nach der Gram'schen Methode.

Herrn Prof. C. Fraenkel, in dessen Institut ich einen Teil meiner Versuche ausführen durfte, möchte ich an dieser Stelle dafür meinen verbindlichsten Dank aussprechen.

Ergänzung.

Seite 371 Zeile 5 von unten ist hinzuzufügen:

Man sieht trotzdem, daß die verwendeten Meerschweinchen zu gleicher Zeit agglutinierende Fähigkeit gegen Typhus und hämolytische Kräfte erwerben bez. behalten haben.

Inhalt.

Frommannsche Buchdruckerei (Hermann Pohle) in Jena.

CENTRALBLATT

für

Bakteriologie, Parasitenkunde und Infektionskrankheiten

Erste Abteilung:

Mediz.-hygien. Bakteriologie u. tier. Parasitenkunde

Originale

In Verbindung mit

Geh. Med.-Rat Prof. Dr. Loeffler, Prof. Dr. R. Pfeiffer, Prof. Dr. M. Braun
Greifswald Königsberg i. Pr.

herausgegeben von

Dr. O. Uhlworm in Berlin W., Schaperstr. 2/3 I

Verlag von Gustav Fischer in Jena

XXXII. Band. —— Jena, den 25. Oktober 1902. —— **No. 8/9.**

Preis für den Band (50 Bogen) 15 Mark. Schwierige Tafeln werden einem Bogen gleich gerechnet. — Die Nummern erscheinen zwanglos je nach dem vorliegenden Stoffe. Bei Einzelverkauf Preis für einen einfachen Druckbogen 40 Pfg., für eine Tafel 60 Pfg.

Hierzu als regelmäßige Beilage die Inhaltsübersichten der II. Abteilung des Centralblattes.

Die Redaktion des „Centralblatts für Bakteriologie und Parasitenkunde" richtet an die Herren Mitarbeiter die ergebene Bitte, etwaige Wünsche um Lieferung von besonderen Abdrücken ihrer Aufsätze entweder bei der Einsendung der Abhandlungen an die Redaktion auf das Manuskript schreiben zu wollen oder spätestens nach Empfang der ersten Korrekturabzüge direkt an den Verleger, Herrn Gustav Fischer in Jena, gelangen zu lassen.

Original-Mitteilungen.

Ueber kleinste Bakterien und das Durchwachsen von Filtern.

[Aus dem hygienischen Institut der Universität Göttingen.]

Von Prof. **Erwin von Esmarch.**

Mit 1 Tafel und 2 Figuren.

Daß es lebende Krankheitserreger giebt, welche den gewöhnlichen pathogenen Bakterien an Größe wesentlich nachstehen müssen, und die daher auch durch unsere besten Mikroskope nicht zu erkennen sind, ist schon seit längerer Zeit bekannt. So wiesen bereits 1898 Nocard und Roux[1]) nach, daß das Virus der Peripneumonie der Rinder durch Berkefeld- und Chamberland-Filter ohne weiteres hindurchpassiert. Sie konnten dasselbe mit Hilfe der Kollodiumsackmethode, später auch

1) Ann. de l'inst. Pasteur. Bd. XII. 1898.

auf einfacherem und festem Nährboden züchten, mikroskopisch aber waren die einzelnen Mikroorganismen so klein, daß etwas anderes als kleinste lichtbrechende Körnchen nicht erkannt werden konnten. Um etwas Aehnliches scheint es sich bei der Maul- und Klauenseuche zu handeln, die von Loeffler und Frosch[1]), ferner bei der Fleckenkrankheit der Tabaksblätter, die von Beijerinck[2]) und der afrikanischen Pferdesterbe, die von Macfadyen näher untersucht worden ist. Und neuerdings ist eine Geflügelseuche von Centanni[3]), von Maggiora und Valenti[4]) und von Lode und Gruber[5]) (in allen diesen Fällen wird es sich wohl um dieselbe Seuche gehandelt haben) beschrieben worden, die allem Anschein nach ebenfalls in die Kategorie dieser Krankheiten zu rechnen sein wird, wenn auch das Virus bisher nicht zu züchten gewesen ist.

Nach alle diesem ist also die Zahl dieser allerkleinsten Infektionserreger durchaus nicht so gering, und es wird unter diesen Umständen angenommen werden können, daß auch unter den saprophytisch lebenden Kleinwesen Aehnliches vorhanden ist. Allerdings ist es wunderbar, daß man sie bisher noch nicht gefunden hat; denn an Versuchen, dieselben nachzuweisen, hat es nicht gefehlt. So z. B. bei den zahlreichen Filterprüfungen, die von den verschiedenen Bakteriologen eingehend unternommen worden sind. Eine ganze Reihe dieser Filter gilt als bakteriendicht und sind es auch zweifellos für die bisher beschriebenen und bekannten Bakterienarten und für eine gewisse Zeit lang.

Selbst wenn man beliebige Fäulnisgemische, die also reich an den verschiedensten Bakterienarten sind, durch solche Filter schickte, wie es z. B. Bitter[6]) mit Kieselguhrfiltern gethan hat, blieb das Filtrat, auch wenn man neue Nährstoffe hinzusetzte, beliebig lange Zeit ohne sichtbare Veränderung, Trübung oder dergleichen.

So nehmen denn auch Lode und Gruber an, daß die oben erwähnten kleinsten und die bakteriendichten Filter ohne weiteres passierenden Krankheitserreger möglicherweise keine Bakterien, sondern vielleicht aus plasmodienartiger Masse bestehende Kleinwesen, oder auch gelöste, aber vermehrungsfähige Substanz, etwa von enzymartigem Charakter, seien.

Aber gegen diese Ansicht ist doch wieder geltend zu machen, daß vielleicht die bisherigen Filterversuche nur deshalb negativ ausgefallen sind, weil im Filtrat nicht die für die durchgehenden Keime geeigneten Lebensbedingungen vorhanden waren. Die bisher an den züchtbaren Kleinwesen der Peripneumonie der Rinder gemachten Erfahrungen sprechen wohl dafür, daß dieselben in dieser Beziehung besonders wählerisch und schwierig zu befriedigen sind. So ist es mir denn doch als lohnend erschienen, die Frage noch einmal experimentell in die Hand zu nehmen. Wenn ja auch die Entdeckung solcher saprophytischen Kleinwesen für den Mediziner kein direktes Interesse beanspruchen darf, würden uns durch die gelungene Züchtung derselben vielleicht wichtige Fingerzeige gegeben werden können, wie wir verfahren müssen, um mit mehr Aussicht wie bisher, auch die obenerwähnten noch nicht zu züch-

---

1) Dieses Blatt. Bd. XXIII.
2) Dieses Blatt. Abt. II. Bd. V. 1899.
3) La clinica veterinaria. 1901. No. 24.
4) Dieses Blatt. Abt. I. 1902. No. 4.
5) Dieses Blatt. Abt. I. Bd. XXX. 1901 u. Bd. XXXI. 1902.
6) Zeitschr. f. Hygiene. Bd. X.

tenden Krankheitserreger auf künstlichen Nährböden zur Vermehrung zu bringen.

Ich ging nun zunächst so vor, daß ich mir ein möglichst vielseitiges Ausgangsmaterial zu verschaffen suchte und verwendete dazu eine ganze Reihe verschiedener Teich- und Grabenwässer, weiter Aufschwemmungen von Boden, Pflanzeninfuse, faulenden Harn, Sputum, Leichenteile, Fäkalien verschiedener Tiere, teils frisch, teils in mehr oder weniger zersetztem Zustande und in Wasser oder physiologischer Kochsalzlösung verdünnt. Im ganzen sind es etwa 35—40 verschiedene Ausgangsflüssigkeiten gewesen, die ich durch Berkefeld-Filter von den gewöhnlichen Bakterien zu trennen versuchte. Dabei wurden in der Regel mehrere der Flüssigkeiten vor der Filtration zusammengegossen, um dadurch die Vielseitigkeit des Filtrates noch zu erhöhen. Filtriert wurde mittels einer Wasserstrahlpumpe und stets mit etwa 17 cm negativem Quecksilberdruck durch das Filter hindurch abgesogen. Das Uebrige ist aus der beigefügten kleinen Skizze leicht zu ersehen. Das Filtrat gelangte aus der Filterkerze in den mit einem dreifach durchbohrten Gummistopfen geschlossenen Glaskolben. Durch die Oeffnung *b* wurde abgesogen, in der Erweiterung des Glasrohres steckte Watte, so daß der Saugeschlauch nach der Filtration einfach abgenommen werden konnte, ohne daß der Inhalt des Kolbens durch eine Außeninfektion gefährdet wurde. *a*, ein starkwandiger Gummischlauch, wurde durch eine sehr starke Schlauchklemme nach der Filtration zugequetscht und der Schlauch sodann auf der Filterseite einfach durchgeschnitten. Die Schlauchklemme hat sich in allen Fällen als bakteriendicht erwiesen. Rohr *c* endlich war zunächst zugeschmolzen, es wurde nach der Filtration aufgesprengt und sodann unter den nötigen Kautelen beliebig von dem Filtrat in einzelne Nährlösungen eingefüllt. War genug entnommen, wurde Rohr *c* wieder zugeschmolzen und konnte sodann der Kolben mit Inhalt in allen Fällen monatelang gegen Außeninfektion gesichert aufgehoben werden. Auch eine spätere mehrfache Entnahme von Flüssigkeit aus *c* ließ sich stets in der gleichen Weise einfach bewerkstelligen, und glaube ich dieses Verfahren für ähnliche Zwecke, d. h. für periodisches Entnehmen steriler Flüssigkeiten aus Flaschen, Pipetten u. s. w. wohl empfehlen zu dürfen. Eine weitere wichtige Frage betraf die Nährlösung, die dem Filtrat zuzusetzen war, sowie die Wachstumsbedingungen, unter denen die mit Nährstoffen versetzten Filtrate aufbewahrt werden sollten. Da ich natürlich vollkommen im Dunkeln tappte, erstrebte ich auch hier möglichste Vielseitigkeit und so habe ich nahezu wohl alle in den bakteriologischen Laboratorien als Nährboden verwendeten Materialien und zwar meist mit jedem Filtrat versucht, wodurch der einzelne Versuch eine recht beträchtliche Ausdehnung gewann, zumal auch noch stets eine Anzahl der mit dem Filtrat vermischten Nährböden unter anaëroben

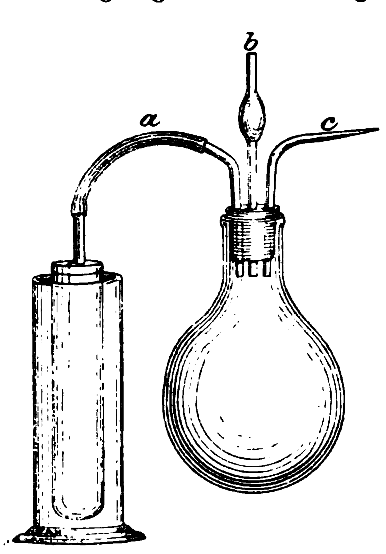


Fig. 1.

Bedingungen und bei sowohl 22° wie bei 37° aufbewahrt wurden. Dieser erheblichen Aufwand an Zeit und Mühe, es ist im ganzen beinahe 50mal filtriert worden, stand ein recht dürftiges Resultat gegenüber, und ich würde mich kaum entschlossen haben, dasselbe zu publizieren, wenn ich nicht auf diese Weise anderen Bakteriologen, die vielleicht ebenfalls auf die Suche nach allerkleinsten Lebewesen gehen wollen, würde unnütze Mühe ersparen können. Auf dem von mir eingeschlagenen Wege scheint es in der That nicht zu gehen; denn in keiner einzigen der zahllosen Filtrate, die, wie erwähnt, in der verschiedensten Weise behandelt wurden, ist es selbst nach monatelangem Aufbewahren zu irgend einer Veränderung gekommen, die darauf schließen ließ, daß man es mit etwas Aehnlichem zu thun hätte, wie zum Beispiel mit dem Infektionserreger der Peripneumonie der Rinder. Trübungen und Bodensätze stellten sich allerdings auf einer ganzen Reihe der Filtratkulturen ein, und mikroskopisch ähnelten dieselben dann häufig den Befunden von Nocard und Roux, eine Ueberimpfung auf neuen Nährboden ist mir aber in keinem Falle gelungen und zum Teil handelte es sich zweifellos auch um kristallische und ähnliche Niederschläge, da sie sich mit Salzsäure vollkommen lösen ließen. Daß trotz meiner mißlungenen Versuche unter den Saprophyten kleinste, durch unsere Mikroskope nicht erkennbare Lebewesen als ziemlich wahrscheinlich vorhanden angenommen werden müssen, ist natürlich selbstverständlich, ich glaube, daß wir eben nur die Lebensbedingungen dieser Mikroorganismen noch nicht kennen und daß aus diesem Grunde auch meine Versuche fehlgeschlagen sind. Wenn diese letzteren aber auch nicht zu dem von mir erhofften Resultat geführt haben, möchte ich doch noch eine Beobachtung anführen, die ich ziemlich zu Anfang meiner Versuchsreihen mit einem gemischten Fäulnisfiltrat gemacht habe. Während sich, wie schon erwähnt, die Filtrate sonst stets wochenlang, d. h. so lange sie überhaupt beobachtet wurden, bakterienfrei hielten — ein neuer Beweis für die Sicherheit der Berkefeld-Filter — zeigte sich in diesem Falle zuerst nach etwa 10 Tagen in dem Originalfiltrat eine leichte diffuse Trübung, die sich unschwer bei mikroskopischer Untersuchung als aus kleinsten kommaförmigen Spirillen bestehend erwies. Allerdings waren sie nur bei stärkster Vergrößerung erkennbar, und es war von vornherein klar, daß es sich um ganz besonders kleine Bakterien handelte. Wunderbar war eben nur, daß dieselben anscheinend im ersten Filtrat, es waren wie in den meisten anderen Fällen auch, nur etwa 300—400 ccm filtriert worden, schon das Filter passiert hatten. Jedenfalls regte der Befund zu weiteren Versuchen an, und es stellte sich denn auch bald heraus, daß für die vorliegende Bakterienart unsere Filter nicht dicht genug sind, um dieselben zurückzuhalten. Ich habe die Spirillen im ganzen 13mal Filter passieren lassen und zwar 7mal große Berkefeld-Filter[1]), je einmal ein Pukall- und ein Reichel-Filter und je 2mal 2 deutsche und 2 französische Chamberland-Kerzen (Marke F controllée). In allen diesen Filtraten, und zwar immer in den ersten 200—300 ccm-Filtrat, fanden sich die kleinen Spirillen wieder, während von den zahllosen anderen in die zu filtrierende Flüssigkeit hineingebrachten Bakterien keine einzige Art das Filter passierte. In einem 14. Fall, es handelte sich um eine französische Chamberland-Kerze, die schon mehrfach gebraucht

1) Die sämtlichen Filter, mit Ausnahme der Berkefeld-Filter, die direkt aus der Fabrik stammten, erhielt ich von Lautenschläger, Berlin, Oranienburgerstraße.

und wieder durch Ausglühen sterilisiert worden war, gingen auch die kleinen Spirillen nicht durch, vielleicht weil die Filterporen doch nicht genügend durch das Ausglühen wieder wegsam geworden waren.

Jedenfalls dürfen unsere verschiedenen Filter, welche bisher in dem Rufe standen, wenigstens anfangs keimfrei zu filtrieren, diesen Vorzug nicht länger mehr in Anspruch nehmen. Daß sie dadurch nicht in ihrer Brauchbarkeit geschmälert werden, ist selbstverständlich; denn der von mir gefundene Mikroorganismus scheint vollkommen avirulent zu sein. Was diesen letzteren nun anbetrifft, so handelt es sich um eine Bakterienart, die ich den Spirillen zuzählen möchte. In den weitaus meisten Fällen wächst er allerdings nur in leicht gekrümmter Kommaform, etwa wie ein verkleinerter Choleravibrio, aber gelegentlich bildet er sich zu sehr schönen Spirillen in künstlichen Nährböden aus. Seine Größe kommt etwa der der Influenzabacillen gleich, jedenfalls ist er bedeutend kleiner, als der Bacillus der Mäuseseptikämie. Ich habe die Größe auch durch direkte Messung im Mikroskop und auf der Mattscheibe im photographischen Apparate festzustellen versucht: in Kanadabalsam und mit Fuchsin gefärbten Präparaten betrug seine durchschnittliche Länge etwa 1—3 μ, seine Dicke etwa 0,1—0,3 μ, während die diesbezüglichen Maße für Influenza 1,2 μ und 0,4 μ, und die für Mäuseseptikämie 3—4 μ und 0,5–0,6 μ sind. Im hängenden Tropfen ist das Spirillum meist lebhaft beweglich, und mittels der Geißelfärbung konnte ich an jedem Spirillum deutlich eine endständige Geißel, ähnlich wie beim Choleravibrio, nachweisen. Sporenbildung habe ich nicht beobachten können, in ganz alten Kulturen bemerkt man allerdings fast regelmäßig, daß der centrale Teil des Spirillum sich intensiv färbt, während die Pole ungefärbt bleiben, auch der Nachweis von Ernst'schen Körnchen durch die Färbung gelingt zuweilen; daß es sich aber nicht um Sporen handelt, geht schon daraus hervor, daß eine auf 80–90° für eine Minute erhitzte Kultur niemals mehr übertragungsfähig ist. Als besten Nährboden fand ich stark verdünnte Bouillon oder Peptonwasser, in welcher es etwa 8—10 Tage nach der Einsaat zu einer leichten Trübung kommt, die sich mikroskopisch als aus den Spirillen bestehend erweist. In alten flüssigen Kulturen wird die Flüssigkeit wieder klar und die Bakterien verfilzen am Grunde in einen zähen Zopf, der besonders beim Umwirbeln der Flüssigkeit ganz charakteristisch aussieht. Als festen Nährboden kann man gewöhnliche Nährgelatine nehmen, besonders wenn man den kohlensauren Kalk ausfällt und ihn durch etwas phosphorsauren Kalk ersetzt. Allerdings kommt es nicht immer zum Anwachsen, namentlich in Plattenkulturen, und es scheint mir, daß daran eine zu starke Verdünnung der Keime die Schuld trägt. Auf alle Fälle dauert es auch hier mehrere Tage, bis das erste Wachstum sichtbar wird. Die Kolonieen bleiben stets ganz klein, sind anfangs bläulich durchscheinend, mit glattem Rand und bekommen später mehr gelbweiße Farbe. In alten Kulturen, namentlich Stich- oder Strichkulturen, tritt oft ein violetter, metallisch glänzender Schimmer hervor. Verflüssigt wird die Gelatine niemals. Agar und Blutserum läßt sich ebenso wie Gelatine verwenden, auf Kartoffeln und in Milch sah ich dagegen keine Vermehrung. Subkutane und intraperitoneale Impfungen an den gewöhnlichen kleinen Versuchstieren blieben erfolglos, an größeren Tieren wurden sie nicht versucht. Diese Angaben werden wohl zur Charakteristik der neuen Bakterienart genügen, der ich vor der Hand den Namen Spirillum parvum geben möchte. Ein besonderes Interesse erregt es wohl sonst nicht, nur das

leichte Passieren der Filter zeichnet es vor den anderen bekannten Bakterien aus. Wie sollen wir uns diese Eigenschaft erklären? Vielleicht genügt seine Kleinheit, verbunden mit der Flexibilität seines Körpers, um ihn durch die gröberen, fast in jedem Filter vorkommenden Kanäle ohne weiteres durchschlüpfen zu lassen. Ich möchte das nach den folgenden kurz zu beschreibenden Versuchen wenigstens annehmen.

Daß unsere anfangs bakteriendichten Filter ziemlich alle nach gewisser Zeit, meist einigen Tagen, doch Bakterien durchlassen, ist schon lange bekannt und wird allgemein als ein Durchwachsen der Filter bezeichnet. Genauere Versuche jedoch, wie dieses Durchwachsen erfolgt, sind vor der Hand noch nicht gemacht worden, wenigstens habe ich darüber nichts finden können in der einschlägigen Litteratur. Von Mehreren wird angegeben (Prochnik, Londoner Kongreß 1891), daß besonders bei Bruttemperatur ein solches Durchwachsen schnell eintritt und Cambier[1]) hat sogar daraufhin ein Verfahren empfohlen, um die schneller durchwachsenden Typhusbakterien von den typhusähnlichen zu unterscheiden; er konnte unter Anwendung nicht näher bezeichneter Porzellankerzen schon in wenigen Stunden ein Durchwachsen der Typhusbacillen beobachten, während er andere Filter, z. B. Chamberland-Filter Marke B und Bougies d'amiante de M. Garros, als nicht für das Durchwachsen geeignet fand. Kübler[2]) bemerkte, daß stets besonders bewegliche Bakterien zuerst das Filter passieren, und Nordmeyer[3]) fand wieder namentlich die Temperatur für die Schnelligkeit des Durchwachsens maßgebend. Lübbert[4]) meinte, daß pathogene Keime durch die Ueberwucherung von Wasserbakterien sicher an einem Durchwachsen der Filter verhindert würden, Kirchner[5]) dagegen sah schon nach 24 Stunden Cholerabacillen im Filtrat von Berkefeld-Kerzen auftreten. Ich könnte diese Litteratur vielleicht noch um einige Angaben vermehren, ohne aber damit viel Neues zu erbringen. Ich habe daher selbst einige Versuche angestellt, um möglichst zu erfahren, wie dieses Durchwachsen der Filter denn eigentlich erfolgt. Zunächst wandte ich einige biologische Methoden an, die mir Aufschluß geben sollten, ob es sich wirklich um ein Durchwachsen der Filter und nicht einfach um ein Durchgesogenwerden der Bakterien oder durch aktive Fortbewegung der beweglichen Bakterien bewirktes Vordringen derselben handelt. Dazu stellte ich einmal Filter ganz ohne Druck in Nährlösung, bis das Niveau der Flüssigkeit innen und außen gleich hoch stand und impfte dann unter verschiedenen Temperaturbedingungen bald innen, bald außen die Flüssigkeit mit Bakteriengemischen oder Reinkulturen verschiedener Arten, worunter auch solche, welche zweifellos keine Eigenbewegung besitzen. Von Tag zu Tag entnahm ich sodann, selbstverständlich unter den nötigen Kautelen gegen eine unbeabsichtigte Infektion, von der ungeimpften Filterseite kleine Proben, die ich auf Nährböden, meist Agar, verteilte, und somit auf das erste Erscheinen der Keime prüfte.

Die Hauptresultate dieser Versuche, im ganzen habe ich 26 angestellt, seien in Folgendem mitgeteilt.

Zunächst konnte ich feststellen, daß in der That ein richtiges Durchwachsen der Filter erfolgt, da bei vollkommenem Ausschluß einer Druck-

---

1) R. Cambier, Compt. rend. 1901. p. 1442.
2) Zeitschr. f. Hyg. Bd. VIII.
3) Zeitschr. f. Hyg. Bd. X.
4) Pharmac. Centralhalle. 1891.
5) Zeitschr. f. Hyg. Bd. XIV.

differenz zwischen Innen- und Außenseite der Filter selbst durch ziemlich dicke Wandungen, wie sie z. B. die Berkefeld-Filter besitzen, Bakterien ohne Eigenbewegung, wie Staphylo- und Streptokokken, sowie Prodigiosus hindurchgelangen.

Die Schnelligkeit des Durchwachsens ist von verschiedenen Momenten abhängig, zunächst, wie schon früher mehrfach beobachtet, von der Temperatur. Vielfach wurde bei sonst vollkommen gleicher Versuchsanlage durch Einsetzen des Filters in 37° die Zeit des Durchwachsens auf die Hälfte verkürzt. So wurde ein Kitasato-Filter bei 37° in 24 Stunden, bei Zimmertemperatur erst in 2 Tagen von Typhusbacillen durchwachsen, dasselbe wurde bei 2 Maassen-Filtern, die einseitig mit Finkler'schen Bacillen infiziert waren, gefunden. Cholerabacillen durchdrangen ein Maassen-Filter im Brütschrank nach 2 Tagen, ein Kontrollfilter, bei Zimmertemperatur gehalten, war nach 13 Tagen noch nicht durchwachsen und wurde es auch nicht, als es sodann in 37° gesetzt wurde, ein Beweis, daß außer der Temperatur auch noch andere Faktoren mitsprechen. Hierzu ist zu rechnen die Größe und Beweglichkeit der Bakterien. Ein kleines Maassen-Filter, welches mit meinen kleinen Spirillen, Prodigiosus und Pyocyaneus geimpft war, ließ die Spirillen nach 8 Tagen, den Pyocyaneus nach 12 Tagen und den Prodigiosus gar nicht durch. Doch kommen hiervon auch Ausnahmen vor. So wurde ein Kitasato-Filter bei 37° vom Staphylococcus aureus bereits nach 24 Stunden, ein anderes von Finkler-Bacillen erst nach 3 Tagen durchwachsen. Ich werde nachher nachweisen, wodurch diese Verschiedenheiten zu erklären sind.

Daß die einzelnen Arten von Filtern nicht alle gleichmäßig ein Durchwachsen gestatten würden, war von vornherein anzunehmen und wurde durch die Versuche bestätigt. Auf Durchwachsen geprüft wurden Berkefeld-Filter, große und kleine, direkt aus der Fabrik bezogen, ferner von Lautenschläger, Berlin, Kitasato-Filter (Katalog No. 680), sowie kleine und größere Maassen-Filter (Katalog No. 695 u. 693). Von diesen schienen kleine Berkefeld-Filter und kleine Maassen-Filter am schnellsten durchwachsen, vom Prodigiosus in 1—3 Tagen, während das große Berkefeld-Filter Prodigiosus sowie Pyocyaneus erst in 7 Tagen, Kitasato-Filter Prodigiosus in 3 Tagen, Pyocyaneus in 8 Tagen durchließ. Die größeren Maassen-Filter erwiesen sich in mehreren Fällen, z. B. einmal für Cholera und 2mal für Streptokokken undurchlässig, d. h. es wuchsen diese Bakterien auch nach Wochen nicht durch, und zwar selbst bei Brüttemperatur nicht, während ein anderes Filter derselben Art die Streptokokken nach 9 Tagen durchwachsen ließ. Mit anderen Worten: es bestehen nicht allein beträchtliche Unterschiede zwischen den verschiedenen Filterarten, sondern auch zwischen den einzelnen Exemplaren derselben Art.

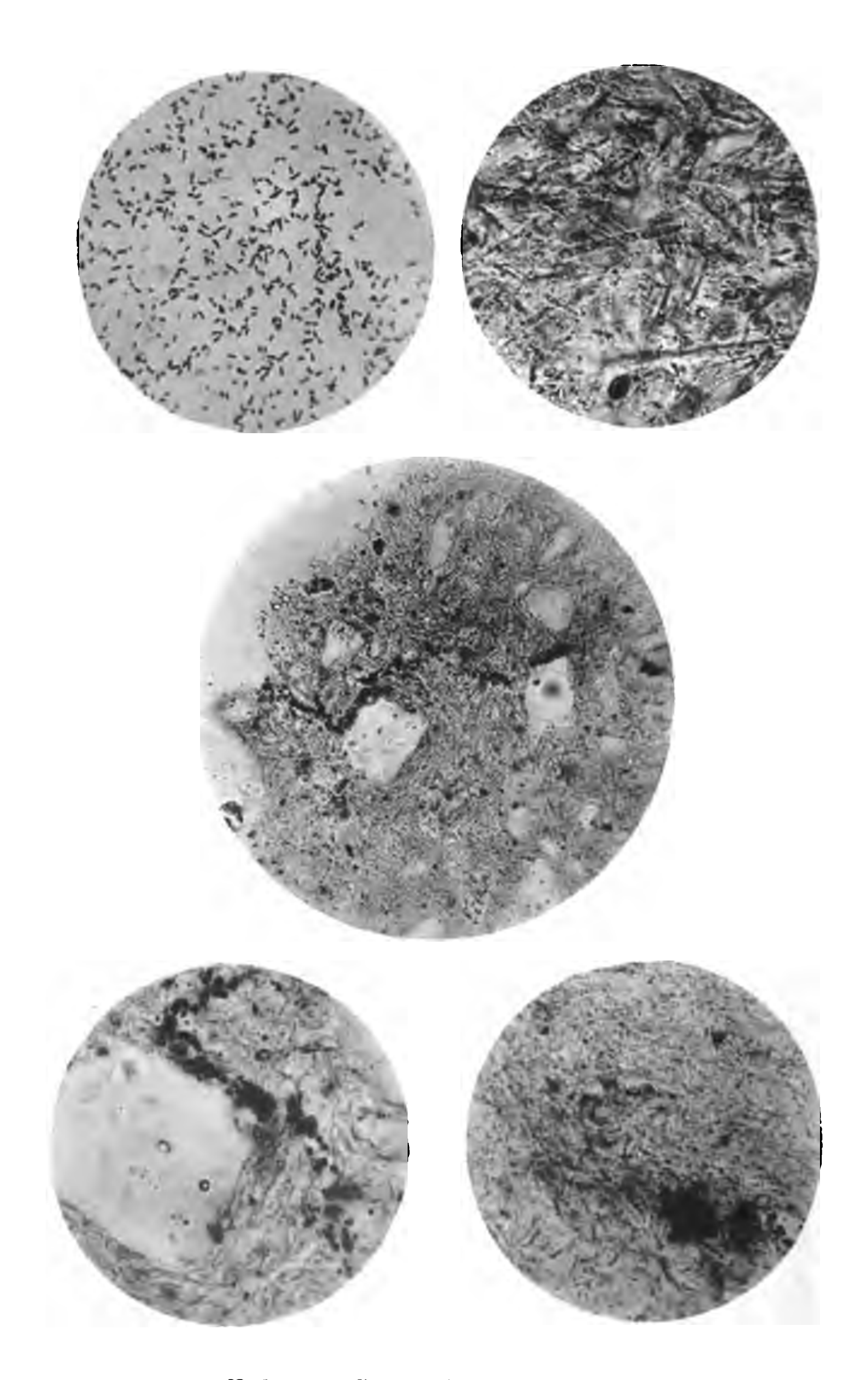
Diese Beobachtung sprach schon mit einiger Wahrscheinlichkeit dafür, daß das Durchwachsen der Filter nicht gleichmäßig in der ganzen Filtersubstanz vor sich geht, sondern daß die Bakterien nur an einzelnen Stellen das Filter durchdringen. Verstärkt wurde zunächst diese Vermutung durch den Umstand, daß sich mehrfach Filter beim absichtlichen Zerbrechen mit größeren Hohlräumen durchsetzt fanden, ja in einem Falle nahm die Höhlung fast die

Fig. 2. Kitasatofilter im Drchschn.

ganze Dicke des Filters ein, so daß an beiden Seiten nur eine papierdünne Wandung vorhanden war (s. Fig. 2).

Einen genaueren Einblick in diese Verhältnisse konnte man natürlich nur durch mikroskopische Dünnschliffe von Filtern gewinnen, die mir in vorzüglicher Ausführung die mechanisch-optische Werkstatt von Brünnée hier anfertigte. Dabei zeigte sich, daß die Struktur der Filter eine sehr verschiedene ist. Die Thonfilter sind so kleinporig, daß selbst bei stärkster Vergrößerung eigentliche Hohlräume nicht zu unterscheiden sind, oder jedenfalls nur hie und da sichtbar werden, während z. B. die Kieselguhrfilter mit lauter größeren Hohlräumen durchsetzt sind, die allerdings wohl zum größten Teil unter sich nicht zusammenhängen, sondern wieder durch kleinporigere Septa getrennt sind. Sehr schön lassen sich an diesen Filtern auch noch die eigentlichen Grundsubstanzen, die Kieselschalen der Diatomeen, erkennen, wie es das beigefügte Photogramm ja auch deutlich zeigt. Noch viel anschaulicher wurden die Verhältnisse, wenn ich vor dem Anfertigen der Dünnschliffe eine wässerige Fuchsinlösung durch das Filter hindurchfiltrierte. In der Regel zeigte dann das Filter beim Zerbrechen in den Querschnitten eine gleichmäßige hellrote Färbung, nur in alten Kitasato-Filtern, in denen die Poren schon zum Teil verstopft waren und die dann überhaupt nur sehr wenig Farbstoff mehr durchließen, fand sich eine ungleichmäßige Färbung der Bruchstellen, wie sie etwa in der nebenstehenden Skizze durch stärkere Schraffierung angegeben ist. Dünnschliffe von solchen gefärbten Filtern erschienen bei stärkerer Vergrößerung nur ganz schwach rosa gefärbt, wohl ein neuer Beweis, daß die Filtersubstanz im ganzen nur aus äußerst feinen Poren besteht, die eine stärkere Ansammlung von Farbe nicht möglich machen. Dazwischen lagen dann die schon erwähnten Höhlungen, die sich bereits bei schwacher Vergrößerung durch intensive Färbung bemerkbar machten, wie bei starker Vergrößerung deutlich wurde, weil ihre Wandungen, zum Teil auch ihr Lumen, wohl weil es färbbare Substanzen enthielt, die Farbe stark angenommen hatten. Am interessantesten sind die mit Bakterien durchwachsenen und gefärbten Filter in den Dünnschliffen. Die Technik ihrer Anfertigung ist ungemein einfach, es wird nach konstatiertem Durchwachsen mit einer bestimmten Bakterienart eine kurze Weile, etwa 5—10 Minuten lang, wässerige Fuchsinlösung durchfiltriert und das Filter sodann getrocknet. In den Filterdünnschliffen fallen auch hier sofort bei schwacher Vergrößerung verschiedene starkgefärbte Stellen auf. Diese enthalten in einzelnen Fällen, nämlich wohl nur dann, wenn die Lücken mit der Außenfläche des Filters kommunizieren, eine mehr oder weniger reiche Ansammlung der betreffenden Bakterien, wie die Photogramme ja deutlich zeigen. Diese bakteriengefüllten Lücken ziehen sich, Kapillaren im Gewebe vergleichbar, oft mehr oder weniger lange verfolgbar, in dem Schliffe hin, je nachdem sie im Längs- oder Querschnitt getroffen worden sind, und liefern wohl den besten Beweis dafür, daß das Filter nicht gleichmäßig, sondern eben nur an diesen Stellen für das Vordringen der Bakterien günstige Gelegenheit bietet. Sie liefern uns weiter die Erklärung, warum die Filter so ungleich schnell durchwachsen werden und warum manche überhaupt keine Bakterien durchlassen. Ein Durchwachsen wird eben nur dann möglich sein, wenn solche Porenkapillaren von der Peripherie des Filters bis ins Innere des Lumens direkt durchgehen.

Für die Praxis geben uns diese hier aufgedeckten Verhältnisse



Verlag von Gustav Fischer in Jena.

einen neuen Beweis dafür, daß man sich auf die Filter nicht unbedingt verlassen kann. Allerdings wird, wenn nur geringe Mengen von pathogenen Keimen in dem zu filtrierenden Wasser vorhanden sind, die Wahrscheinlichkeit nicht sehr groß sein, daß nun diese Keime gerade in einen solchen kapillaren Kanal hineingesogen werden, der das ganze Filter durchsetzt, aber möglich ist es natürlich immerhin, und es wäre wünschenswert, daß es gelänge, die Filter durchweg so gleichmäßig in ihrer Masse darzustellen, daß gröbere durchgehende Spalten nicht mehr in ihnen vorkommen. Dann würde man sich auch dauernd auf dieselben verlassen können.

Erklärung zu den Photogrammen.

(Dieselben sind von Herrn Dr. Reichenbach angefertigt worden, welchem ich dafür zu Dank verpflichtet bin.)

Fig. 1. Spirillum parvum, Reinkultur, Fuchsinfärbung. 1000:1.

Fig. 2. Berkefeld-Filterdünnschliff, 1000:1. Die Kieselskelette der Diatomeen sind noch deutlich erkennbar.

Fig. 3. Kitasato-Filterdünnschliff von Staphylokokken durchwachsen, 500:1. Man sieht den zickzackförmig verlaufenden Kanal durch die Anfüllung der gefärbten Kokken. Links äußere Oberfläche des Filters.

Fig. 4. Dasselbe Präparat wie Fig. 3, 1000:1. Man erkennt deutlich einzelne Kokken.

Fig. 5. Maassen-Filterdünnschliff von Finkler-Bacillen durchwachsen. Links unten der Querschnitt eines mit Bacillen gefüllten Kanales. Mehr in der Mitte ist ein einzelner Kommabacillus deutlich sichtbar. 1000:1.

Ein Beitrag zur Biologie der Anaëroben.

Von **Karl Koniński**, Stadttierarzt in Krakau.

Anläßlich einer Reihe von Paralleluntersuchungen über die kulturellen Merkmale der Rauschbrand- und der Oedembacillen habe ich Gelegenheit gehabt, einige Beobachtungen zu machen, deren Veröffentlichung nicht ohne Interesse sein dürfte[1]). Es betreffen dieselben gewisse Besonderheiten des Wachstums dieser Mikroben in den gewöhnlichen Nährböden Agar, Gelatine, Bouillon, und muß deshalb die Darlegung dieser Eigentümlichkeiten von bereits bekannten Sachen ausgehen.

Agar. Die Kultur der Anaëroben in hoher Schicht dieses Nährbodens wird allgemein angewendet, und es sind, nach meinen Erfahrungen, die von Kitasato und Weyl[2]) empfohlenen Zusätze von reduzierenden Mitteln gar nicht notwendig, da sie — mit wenigen Ausnahmen, wovon weiter gesprochen werden wird — das Wachstum bloß verzögern, anstatt fördernd zu wirken. Als Unterschied zwischen Rauschbrand und Oedem im Agarstiche kann die Zartheit des Oedemstiches — der Kompaktheit und Rauheit des Rauschbrandstiches gegenüber — hervorgehoben werden, sowie das im allgemeinen tiefere Beginnen desselben. Ein weiterer Unterschied kommt erst nach Unterbrechung des Wachstums und der Vermehrung der Mikroben infolge Einstellung der Kulturen in die Kälte

1) Den Gegenstand der Untersuchung bildeten von Král (Prag) bezogene Stämme, und gelten daher folgende Angaben vorläufig nur für solche, vielleicht durch längere Zucht abgeänderte Kulturen.

2) Zur Kenntnis der Anaëroben. (Zeitschrift für Hygiene. Bd. VIII.)

(Keller) zu Tage. Unter diesen Verhältnissen bemerkt man nach wenigen Tagen, daß das Rauschbrandband zarter geworden, das Oedemband aber in der Regel ganz geschwunden ist, Abimpfungen von solcher unsichtbarer Kultur jedoch noch immer wirksam sind. Auf den Mechanismus dieser Erscheinung wirft folgende Versuchsanordnung Licht: In möglichst breiten Kochbechern werden hohe Schichten Agar gegossen und dicht an der Wand des Glases mit Rauschbrand oder malignem Oedem geimpft. Nach Einstellung der Kulturen in den Brutschrank sieht man am folgenden Tage, bevor noch Gasblasen entstanden sind, die Spuren der Einstiche als obenbeschriebene opake Bänder, und würde man geneigt sein, die Kulturen an diesen Stellen lokalisiert zu glauben. Die Versuche, die ich anstellte, lehrten jedoch, daß Abimpfungen von den entlegensten Stellen immer fertil sind, daß sich also sowohl die Oedem- wie die Rauschbrandbacillen durch die ganze Masse des Agars bereits zerstreut haben. Daß es sich nicht um mechanische Hinreißung durch Gasblasen handelt, wird schon durch den Mangel derselben bewiesen (die Gasblasen entstehen erst am 2—3. Tage infolge eben der Zerstreuung der Bacillen), und sind wir also zu dem Schlusse gezwungen, daß sich die Bacillen eben dank ihrer eigenen Beweglichkeit nach allen Seiten aktiv fortbewegt haben. Die festweiche Masse des Agars hindert also ihre Bewegungen nicht; daß diese Bewegung in halbfesten Medien eben durch die Bewegungsorgane dieser Bakterien, ihre „Geißeln", zustande kommt, ist selbstverständlich, nur muß für dieselben — in diesen Verhältnissen — ein amöboider, pseudopodienförmiger Gestaltwechsel postuliert werden, eine Eigenschaft, die wahrscheinlich allen Bakteriengeißeln zukommt (vergl. den Proteus vulgaris Hauser). Es könnte die Aufgabe eines besonderen Studiums bilden, durch Schnitte im fixierten Agar die Bakterien in ihrem Fortschleichen zu ertappen und die Formen, welche die Geißeln hier annehmen, zu studieren. Durch diesen Befund wird die bisher auffällige Thatsache, daß in festem Agar gezüchtete Rauschbrand- und Oedembacillen dennoch schön gegeißelt gefunden werden, ihrer Erklärung zugeführt[1]).

Zuckeragar. Die Kulturen in diesem Nährboden unterscheiden sich von denen in Agar durch spärlichere Gasbildung, durch andere Beschaffenheit des Stiches, sowie durch noch größere Beweglichkeit der Bakterien, welche, vom Stiche aus nach allen Seiten rasch ausschwärmend, gleich am 2. Tage auf den Wänden des Glases ringsherum in Gestalt eines schleierartigen Belages dichte Kolonieen bilden. Unter Umständen, nämlich bei durch vorherige Züchtung in nicht passenden Nährböden (antiseptisch wirkende, reduzierende Mittel, Stoffwechselprodukte der eigenen Art) abgeschwächten Varietäten, bleiben diese Ansiedelungen aus, und bleibt alsdann die Kultur schön durchsichtig. Unterschiede zwischen Rauschbrand und malignem Oedem sind hier nicht vorhanden, und an beiden bemerken wir, daß die Ansiedelungen auf dem Glase

1) Obiger Versuch kann mannigfach variiert werden, immer mit demselben positiven Resultate, d. h. Schwärmvermögen der Bacillen in der festen Masse des Agars, sowohl in der Wärme wie in der Kälte (6—7° C). Das Verschwinden des zarteren Oedemstiches ist eben die Folge des Zerstreuens der Mehrzahl der denselben bildenden Bacillen, im Rauschbrandstiche wird seiner Dichte wegen dieser Prozeß nicht so leicht merkbar. In der Brutwärme geht Vermehrung und Bewegung gleichzeitig vor sich und kommt daher diese letzte nicht so rein zum Ausdruck. Selbstverständlich ist diese aktive Beweglichkeit von der sogenannten „Wachstumsbewegung" ganz verschieden.

fast unmittelbar unter der Oberfläche des Agars beginnen. Dieser merkliche Hang zur Aërobiose wird besonders ausgesprochen stark bei denjenigen Kulturen, welche mit aërobem Materiale (Kulturen in „Coli-Zuckerbouillon") angelegt waren.

Gelatine. Hier wächst (im Stich) unter gewöhnlichen Verhältnissen sowohl Rauschbrand wie Oedem in Gestalt einer Reihe von weißen Körnern, von welchen nach allen Seiten kurze, etwa 2—3 mm messende Strahlen ausgehen. Zum Unterschiede gegen Rauschbrand, welcher nach oben höher steigt und hier knöpfig endet, nimmt die Entwickelung der Oedemkörner nach oben ab, sie werden kleiner, die Strahlen kürzer. Wenn man hier, durch Einstellung in den Eisschrank, die weitere Entwickelung unterbricht, so kann man die Kultur unverändert beliebig lange Zeit aufbewahren (das obenbeschriebene Schwärmen der Bacillen findet hier also nicht statt), anderenfalls kommt es mit der Zeit zur Verflüssigung der Gelatine mit langsamer Entwickelung einer Gasblase. Anders verhält es sich jedoch mit Kulturen aërober Provenienz (s. unten): Hier hält die Peptonisation der Gelatine mit der Entwickelung der Bakterien etwa gleichen Schritt und kommt es fast von vornherein zur Verflüssigung der Gelatine und starker Trübung derselben durch die massenhaft darin sich vermehrenden Bakterien, eine bemerkenswerte, hervorgehoben zu werden verdienende Beziehung zwischen fakultativer Aërobiose und Peptonisierungsvermögen, durch welche der von Liborius (Zeitschrift für Hygiene. Bd. I. p. 115) erkannte Zusammenhang zwischen dem Zutritt freien Sauerstoffes und der peptonisierenden Enzymbildung eine folgerungsreiche Erweiterung erfährt.

Flüssige Nährböden, Bouillon. Die bezüglichen Versuche bezweckten erstens die Ermittelung der passendsten Nährböden, und wurde hier die von Leclainche et Vallée (Ann. Pasteur. 1900) für Rauschbrand empfohlene Bouillon Martin auch für malignes Oedem geprüft, wobei sich dieselbe thatsächlich als adäquatester Nährboden für beide Mikroorganismen herausstellte, und zweitens in der Hoffnung, dieselben zur aëroben Entwickelung bringen zu können, wurden, trotz der negativen Ergebnisse Kitasato und Weyl's, die von denselben gebrauchten reduzierenden Mittel, wie auch das von Trenkmann (dieses Blatt. Bd. XXIII) mit Erfolg verwendete Natriumsulfit auf ihre Brauchbarkeit zu obigem Zwecke geprüft, ohne jedoch auch nur in einem Falle in solchen Lösungen den Beginn einer aëroben Entwickelung beobachten zu können.

Nach abermaliger Impfung derselben Bouillon nach Ausschluß des Sauerstoffes (durch Ueberdecken mit Paraffin) zeigte es sich — ausgenommen Eikonogen und ameisensaures Natrium, wo eine fördernde Wirkung sich ganz ausgesprochen geltend machte — daß der Zusatz solcher Stoffe zur Bouillon in der größten Mehrzahl der Fälle die Entwickelung der Mikroben entweder verzögerte (Resorcin, Hydrochinon, Chinon, indigschwefelsaures Natrium, Benzaldehyd, Pyrogallol, Natriumsulfit) oder ganz hinderte (Brenzkatechin, Pyrogallol).

In allen Versuchen mit flüssigen Nährböden wurde zuvörderst, wie gesagt, mit aërober Züchtung begonnen und erst später, nach Mißlingen des Versuches, zur anaëroben Methode übergegangen. Diesem Umstande eben, d. h. der systematischen Prüfung auf eventuell unter bestimmten Umständen vorkommende Aërobiose, war es zu verdanken, daß thatsächlich in 4 Fällen fakultative Aërobiose in reinen Kulturen beobachtet

wurde, dreimal bei Rauschbrand, einmal bei malignem Oedem. Es versteht sich dabei von selbst, daß durch eine Reihe von sorgfältigen Kontrollversuchen die Eindeutigkeit des Resultates zweifellos bestätigt und eine Mischinfektion ganz ausgeschlossen wurde. Aërobe Entwickelung kam nämlich vor in Bouillon Martin, in gewöhnlicher Bouillon + 5 Proz. Glycerin und in „Coli-Zuckerbouillon“ [1]) bei Rauschbrand, in derselben „Coli-Zuckerbouillon“ bei Oedem. Die zwei ersten Fälle gleichen den von Kitt für Rauschbrand beschriebenen (dieses Blatt. Bd. XVII), in den letzten Fällen haben wir es wahrscheinlich mit den Stoffwechselprodukten des B. coli zu thun, wie sie für Stoffwechselprodukte verschiedener Bakterien von Kedrowski beschrieben wurden, denn in gewöhnlicher Zuckerbouillon kamen solche nicht vor. In allen Fällen von aërober Entwickelung waren die äußeren Merkmale der Kultur dieselben, Trübung, Gärung (d. h. starke Gasbildung) und bei zuckerlosen Nährböden widerlicher Geruch, wogegen in Coli-Zuckerbouillon bloß starker Buttersäuregeruch bei allen drei Zuckerarten scharf auftritt. Ob bei dieser aëroben Entwickelungsweise Sporenbildung regelmäßig vor sich ging, wurde nicht geprüft, jedenfalls mußte diese Lebensweise als ein stark den normalen Stoffwechsel beeinflussender Eingriff gedeutet werden, indem, wie bereits erwähnt, außer Persistieren der aëroben Tendenz auch erhöhtes Peptonisationsvermögen der Gelatine bei in solcher Weise „trainierten“ Bakterien zweifellos von mir beobachtet wurde.

Die Symbiose von Anaëroben mit Aëroben in O-haltigen Kulturen wurde bereits von mehreren Autoren beschrieben, und sind als solche, die Entwickelung der Anaëroben in sauerstoffhaltigen Milieus ermöglichende Mikroorganismen bereits viele bekannt; ihre Reihe muß nun durch Micrococcus candicans vermehrt werden, welcher von mir in einem Falle als Symbiont des Rauschbrandes aus einer aëroben Mischkultur isoliert und als solcher bestimmt wurde. Weitere Untersuchungen lehrten nun, daß die gleichzeitige Entwickelung des Micrococcus candicans sowohl für Rauschbrand- wie für Oedembacillen die Bedingungen schafft zum üppigsten Gedeihen in allen flüssigen Nährböden trotz Anwesenheit des Sauerstoffes — eine, angesichts der allgemeinen Verbreitung des Micrococcus candicans, gewiß nicht bedeutungslose Thatsache. Ueber den Einfluß dieses Mikroben auf Anaëroben in festem Nährboden (Agar) belehren nachfolgende Versuche, welche zugleich einen Beitrag liefern zu dem obenbeschriebenen Schwärmvermögen der Rauschbrand- und der Oedembacillen in solchen Substraten.

Auf schiefem Agar (Kontrollversuche zwecks Eruierung etwaiger Verunreinigung) werden Striche mit Rauschbrand- und Oedemkulturen angelegt und bleiben dieselben natürlich alle steril. 6—8 Tage später werden dieselben, bis da im Brutschrank gehaltenen Eprouvetten mit Micrococcus candicans geimpft und am folgenden Tage schöne Kulturen desselben erhalten, was eine Diffundierung seiner Stoffwechselprodukte in die Masse des Agars zur Folge haben mußte, und nun werden, etwa 2—3 Tage später (8—14 Tage nach dem Besäen mit

---

1) Gewöhnliche Nährbouillon wird mit Coli geimpft, nach 24 Stunden sterilisiert, filtriert, mit 1½ Proz. Zucker (Trauben-, Milch-, Rohrzucker) vermengt und eventuell abermals filtriert. Es entwickelten sich sowohl Rauschbrand- wie Oedembacillen in solcher Bouillon mit der größten Ueppigkeit, sie starben aber auch verhältnismäßig schnell ab.

Rauschbrand- und Oedembacillen), in allen Gläsern in der Tiefe des Agars die Entwickelung der eingebrachten und inzwischen in der Masse des Nährbodens von der Oberfläche her sich aktiv zerstreut habenden Anaëroben konstatiert und durch Kontrollimpfungen sicher gestellt. In einem Falle wird mit einer abgeschwächten Rauschbrandkultur ein Stich in Zuckeragar angelegt, und bleibt derselbe trotz anhaltendem Verbleiben im Thermostaten steril. 8 Tage später wird die Oberfläche des Agars mit Micr. candicans geimpft, und nun bemerkt man 2 Tage später neben einer schönen Kolonie des Aëroben auf der Oberfläche den ursprünglichen, bisher nicht sichtbaren Stich in größter Schönheit in der durchsichtigen Masse des Agars prangen — ein Versuch, welcher überall dort angewendet zu werden verdient, wo das Vorhandensein von Anaëroben vermutet wird und durch spezielle Förderung demonstriert werden soll. (An der Oberfläche des Agars eine Strichkultur des Rauschbrandes oder malignen Oedems in Gegenwart von Micr. candicans zu erhalten, ist mir nicht gelungen.)

Außer Bouillon wurden auch einfachere, aus Pepton, Zucker, Asparagin, weinsaurem Ammonium zusammengesetzte Nährlösungen auf ihre Verwendbarkeit zur Kultur der untersuchten Anaëroben geprüft, doch konnte bloß in einer derselben (1 Proz. Pepton, 1 Proz. Traubenzucker, 100 Wasser) der Rauschbrand nach Abschluß des Sauerstoffes durch Paraffindecke zur Entwickelung gebracht werden, jedoch mit den Merkmalen der Krankhaftigkeit: Abwesenheit von Gas und Geruch, sehr geringe Trübung, Agglutination der entwickelten Bakterien und infolgedessen Flöckchenbildung und rasche vollkommene Klärung der Flüssigkeit. In Zuckeragar geimpft, gaben sie jedoch wieder eine typische Kultur.

Hier wurden die Versuche unterbrochen und sollen vorläufig nicht weitergeführt werden. Es ist mir eine angenehme Pflicht, dem verehrten Vorsteher des Hygienischen Institutes zu Krakau, wo dieselben ausgeführt wurden, Herrn Prof. O. Bujwid, für seine mir bewiesene Zuvorkommenheit meinen wärmsten Dank auszusprechen.

Ein die Gelatine verflüssigender Pneumococcus.

[Aus dem Hygienischen Institute der Universität Halle a. S., Direktor: Prof. Dr. C. Fraenkel.]

Von **A. Kindborg**, M. D.

Bei einer aufmerksamen Durchsicht der ungemein ausgedehnten und inhaltreichen bisher vorliegenden Litteratur über den Pneumococcus wird dem Leser gewiß hier und da schon der Verdacht aufgestiegen sein, daß wir hier gar nicht einen einheitlichen Mikroorganismus, sondern nur eine Gruppe freilich sehr nahe verwandter und ähnlicher Bakterien vor uns haben. Indessen an einem thatsächlichen Beweis für diese Annahme fehlt es im großen und ganzen doch noch, und schon deshalb wird jeder auch noch so bescheidene Beitrag zur Beantwortung der eben aufgeworfenen und angedeuteten Frage gewiß nicht unwillkommen sein. Einen solchen bringen nun die folgenden

Zeilen: sie beschreiben einen Pneumococcus, der alle Eigenschaften eines echten Vertreters seiner Art besitzt, der sich aber durch ein recht auffälliges Merkmal doch von der übergroßen Mehrzahl der bisher bekannten unterscheidet, nämlich durch die Fähigkeit, die gewöhnliche Nährgelatine rasch und energisch zu verflüssigen.

Fundort.

Der betreffende Diplococcus entstammt einem Fall von croupöser Pneumonie aus dem hiesigen Garnisonlazareth und ist aus dem uns übersandten typischen rostbraunen Sputum sowohl auf dem Wege der Züchtung wie durch unmittelbare Verimpfung auf das Tier, die Maus, zugleich isoliert worden. Da sich andere Bakterien daneben nicht oder doch nur in ganz geringer Menge nachweisen ließen, so dürfen wir wohl mit großer Wahrscheinlichkeit annehmen, daß es sich hier um den Erreger des betreffenden Krankheitsfalles handelt.

Morphologie.

Die einzelnen Individuen stellen sich als große, lancettförmige Diplokokken dar, welche fast immer in der bekannten, durch den Namen angedeuteten Weise gelagert sind, und auch in flüssigen Nährmedien nur selten kürzere Ketten von höchstens 3 bis 4 Gliedern bilden. In Präparaten aus dem Tierkörper, aber auch aus jungen Kulturen kann man stets eine deutliche Kapsel beobachten, die bei den üblichen Färbungen, am besten nach der Methode von Boni[1]) oder aber auch bei einfacher Behandlung mit Karbolfuchsin hervortritt. Der Bakterienleib selbst nimmt leicht alle Anilinfarben an und ist auch dem Gramschen Verfahren zugänglich.

Kulturelles Verhalten.

Die Züchtung gelingt ohne Schwierigkeit auf den gewöhnlichen festen und flüssigen Nährböden und das Wachstum ist im allgemeinen sogar üppiger als das anderer Pneumokokkenstämme. In Uebereinstimmung mit diesen ist auch unser Mikroorganismus nur gegen eine stark alkalische Reaktion der Substrate sehr empfindlich, während er auf schwach sauren gut, am besten aber auf schwach alkalischen Böden gedeiht. Sein besonderes Verhalten auf der Nährgelatine haben wir bereits kurz hervorgehoben. Die Peptonisierung wurde niemals vermißt, begann bei einer Temperatur von 22° C bereits innerhalb von 24 Stunden und schritt dann so rasch vorwärts, daß nach 3—4 Tagen die ganze im Röhrchen befindliche Masse des Nährstoffes verflüssigt war. Bei niedrigerer Temperatur geht der Prozeß natürlich entsprechend langsamer vor sich; immerhin war er auch in solchen Kulturen, die bei einer Temperatur von durchschnittlich 9° C im Eisschrank aufbewahrt wurden, schon nach 7 Tagen vollzogen. Vermögen aber selbst recht niedrige Wärmegrade das Wachstum noch nicht wesentlich zu beschränken, so liegt andererseits doch das Optimum für die Entwickelung wie bei anderen Pneumokokken bei Brütwärme. Am besten gedeiht der Mikroorganismus daher auf Agar-Agar oder aber auf der von Guarnieri[2]) angegebenen Agargelatine, die gemäß ihrem

---

1) Centrabl. f. Bakt. etc. Abt. I. Bd. XXVIII. p. 705.

2) Atti dell' Accadem. medica di Roma. Vol. IV. 1888. Vergl. Flügge, Die Mikroorganismen. Bd. II. p. 118.

Gehalt an Gelatine, an Leim, ganz verflüssigt wird, während sie sonst auch bei 37° C noch eine halbfeste Masse darstellt.

Das Aussehen der Kulturen ist auf allen den genannten Medien, abgesehen von geringen, durch das verschiedene Medium selbst bedingten Differenzen in der Transparenz ungefähr das gleiche; die Oberfläche des Nährbodens ist mit einem zarten, durchscheinend grauweißen Ueberzuge bedeckt, der aus feinsten Perlchen zusammengeflossen erscheint. In der Gelatinestichkultur tritt längs des ganzen Stichkanals Wachstum in Form vieler kleiner Einzelkolonieen ein; von der Oberfläche senkt sich dann nach kurzer Zeit ein Verflüssigungstrichter in die Tiefe. Auf der Platte erscheinen die Kolonieen bei schwacher Vergrößerung ebenfalls aus lauter Körnchen zusammengesetzt und der Rand zeigt deshalb ein gekerbtes Aussehen. Die Züchtung gelingt ferner auch noch z. B. auf gekochten Eiern oder auf sterilen Kartoffeln, wie bei einigen anderen Pneumokokkenarten. Auf beiden Substraten bildete unser Mikroorganismus einen trockenen, kaum sichtbaren Rasen. In Bouillon erfolgt das Wachstum zuerst in Gestalt einer gleichmäßigen, wolkigen Trübung, die dann allmählich einer Klärung und Sedimentierung Platz macht. Milch wird in 3—4 Tagen zur Gerinnung gebracht.

Wirkung auf den Tierkörper.

Der kurz so gekennzeichnete Pneumococcus, der, wie gesagt, wahrscheinlich als Erreger eines Falles von Pneumonie beim Menschen betrachtet werden muß, erwies sich im Tierversuch als pathogen für weiße Mäuse, dagegen nicht für Kaninchen, die sonst bekanntlich gegenüber dieser Bakterienart sehr empfindlich sind, obwohl wir alle Infektionsmethoden versuchten und auch sehr große Mengen einspritzten. Auch bei Mäusen bedurfte es freilich immerhin mindestens $^1/_2$ ccm einer 24-stündigen Bouillonkultur, um den Tod in 1—2mal 24 Stunden herbeizuführen. Es gelang dann leicht, im Herzblut die typischen kapseltragenden Diplokokken wieder aufzufinden und in Reinkultur zu gewinnen. Eine wesentliche Steigerung der Virulenz durch fortgesetzte Passagen wurde nicht erzielt, allerdings auch nur in beschränktem Umfange versucht.

Das Fehlen der pathogenen Wirkung für Kaninchen ist einigermaßen auffällig, aber doch auch bei anderen Pneumokokkenarten, so z. B. von Neufeld[1]) und Banti[2]) schon wiederholentlich beobachtet worden.

Das Vorkommen eines die Gelatine verflüssigenden Pneumococcus gehört ohne Zweifel zu den größten Seltenheiten, ist indessen doch nicht ganz ohne Beispiel. Bei genauer Prüfung der einschlägigen Litteratur sind vielmehr zwei ähnliche Funde zu unserer Kenntnis gelangt, in denen es sich freilich der Beschreibung nach jedesmal um einen von dem meinigen verschiedenen Coccus gehandelt hat. Das gilt einmal für die Beobachtung von Kruse und Pansini[3]), deren Coccus sich bei der Kultur ganz anders verhielt, insofern er erstens lange Ketten bildete, ferner bei etwas niederer Temperatur — 18° C — weniger gut zur Entwickelung gelangte als der unserige, und in Bouillon

1) Zeitschr. f. Hygiene. Bd. XXXVI. p. 257.

2) Sull' eziologia delle pneumoniti acute. (Lo Sperimentale. Vol. XLIV. 1890. Fasc. 4—6. p. 349, 461, 573. Ref. Centralbl. f. Bakt. Bd. IX. 1891. p. 180.)

3) Zeitschr. f. Hygiene. Bd. XI. 1892. p. 279.

nicht eine gleichmäßige Trübung hervorrief, sondern sich zu Fetzen und Flocken zusammenfügte. Außerdem brachte er die Milch schneller zur Gerinnung und verflüssigte namentlich die Gelatine in weit geringerem Maße, und zwar nur bei höherer Temperatur und vorübergehend. Das letztere trifft auch für das zweite Beispiel zu, den Pneumococcus, mit welchem Eyre und Washbourn[1]) Versuche angestellt haben. Auch bei diesem lassen sich freilich daneben noch weitere, von unserem Mikroorganismus abweichende Merkmale verzeichnen, so besonders sein Wachstum auf Agar in Form dicker, wie „weißgestrichener" Belage, ein stärkeres Wachstum auf Kartoffel und das morphologische Aussehen, das zeitweilig an das des Gonococcus erinnert haben soll, die Lagerung in großen Haufen, u. s. f. Außerdem sind dann noch einige andere die Gelatine verflüssigenden Diplokokken beschrieben worden, die jedoch sicherlich nicht in die Gruppe des Pneumococcus gehören, sich schon durch ihre Herkunft von ihm unterscheiden und deshalb von den betreffenden Autoren überhaupt gar nicht hierher gerechnet werden.

Nachdruck verboten.

Ueber das Vorhandensein der sogenannten säureliebenden Bakterien im Stuhle des erwachsenen Menschen.

[Aus dem hygienischen Institute der Universität Genua (Direktor: Prof. P. Canalis).]

Von Dr. **Angelo Cipollina.**

Nach den von Finkelstein[2]), Moro[3]), Escherich[4]) und Rodella[5]) angestellten Untersuchungen steht es nunmehr fest, daß im Kote der Säuglinge sich fast immer Keime finden, welche fähig sind, sich zu in ausgeprägter Weise sauren Nährmitteln entwickeln zu können, wie z. B. die 1-proz. essigsaure Bouillon. Diese Keime sind wegen ihrer erwähnten Eigenschaft „acidophili" benannt worden, obgleich sie sich in Wirklichkeit besser in alkalischen Substanzen als in Säuren entwickeln. Es sind Bacillen, welche eine gewisse Aehnlichkeit mit den Diphtheriebacillen haben; sie färben sich nach der Gram'schen Methode und sie entwickeln sich in den gewöhnlichen Nährmitteln (am besten in denjenigen, welche Traubenzucker enthalten) bei der Temperatur des Thermostaten, indem sie eine bedeutende Pleomorphie zeigen, so daß die Forscher nicht mit Sicherheit feststellen konnten, ob es nur eine oder mehrere Arten von säureliebenden Bacillen giebt.

Da die Bacilli acidophili im Kote des erwachsenen Menschen noch nicht einem Studium unterworfen waren, habe ich es für interessant erachtet, darauf bezügliche Untersuchungen einzuleiten, zu welchem Zwecke ich auf folgende Weise verfuhr:

Ein Reagenzglas 1-proz. essigsaurer Traubenzuckerbouillon (d. h. 1-proz. Traubenzuckerbouillon, welcher vor der Sterilisation 1 Proz.

---

1) Journal of Pathology and Bacteriology. Vol. IV. p. 394.
2) Dtsch. med. Wochenschr. Bd. XXII. 1900. No. 16.
3) Jahresber. f. Kinderheilk. 1900. Juliheft.
4) Ebenda.
5) Centralbl. f. Bakt. etc. Abt. I. Bd. XXIX. 1901. p. 717.

konzentrierte Essigsäure hinzugefügt wurde) wurde mit möglichst frischem Kote eines erwachsenen Kranken der medizinischen Klinik reichlich infiziert. Nach 24 Stunden zeigte sich die essigsaure Bouillon gleichmäßig trübe; die Kotüberreste befanden sich auf dem Boden des Reagensglases; darauf übertrug man 2 Oesen der essigsauren Bouillon in einfache Traubenzuckerbouillon und nach weiteren 24 Stunden 2 Oesen der letzteren in sterilisierte Milch.

Auf diese Weise studierte ich den Kot von 20 Kranken und konnte mich sofort von zwei Thatsachen überzeugen:

1) Von dem fortwährenden Vorhandensein von Keimen im Kote des erwachsenen Menschen, welche die Eigenschaft besitzen, sich in essigsaurer Bouillon zu entwickeln;

2) von dem Vorhandensein von wenigstens 2 Arten säureliebender Keime, weil in einigen Fällen die Milch sofort gerann (24, 48 Stunden), während sie in anderen Fällen nicht einmal nach vielen Tagen gerann.

Bei genauerer Untersuchung und mit Verwertung der Plattenkultur wurde es mir möglich, von dem untersuchten Kote 4 ganz bestimmte Arten von Keimen zu isolieren, die fähig sind, sich in essigsaurer Bouillon zu entwickeln, und von denen die eine dem aus dem Kote der Neugeborenen isolierten Bacillus acidophilus ähnlich ist, 2 andere der Gruppe des Bacterium lactis acidi angehören, während die 4. spezielle Kennzeichen hat, die sie von den Vorgenannten unterscheidet.

Ich glaube, hier eine kurze Beschreibung der einzelnen isolierten Bakterien folgen lassen zu müssen, indem ich mir vorbehalte, zum Schlusse einige Betrachtungen zu machen.

I. Bacillus lactis acidi. Derselbe ist kurz, gegen die Enden lanzettförmig zugehend, gewöhnlich zu zweien vereinigt und so eingekapselt, daß er zuweilen das charakteristische Aussehen eines großen Diplococcus annimmt. Andere Male erscheint er zu kleinen, aus kurzen Bacillen oder aus kegelförmigen, eirunden Elementen gebildeten Ketten vereinigt. Er ist unbeweglich, giebt keinen Anlaß zur Sporenbildung und färbt sich nach der Gram'schen Methode. Er entwickelt sich in der Temperatur des Thermostaten in einfacher Bouillon spärlich, dagegen in üppiger Weise und mit starker Säureentwickelung in 1-proz. Traubenzuckerbouillon; in den Schmidt'schen Röhren in Traubenzuckerbouillon kultiviert, erzeugt er keine Gasentwickelung. — Die Milch gerinnt in 24—48 Stunden. Dieser Bacillus entwickelt sich in der gewöhnlichen Gelatine, indem er im Zeitraume von 3—4 Tagen kleine, weiße, stecknadelkopfförmige Kolonieen bildet, welche an Größe nicht zunehmen; die Gelatine wird nicht flüssig. Auf dem Agar entwickelt er sich bei der Temperatur des Thermostaten, indem er innerhalb 24 Stunden eine ganz dünne, durchsichtige Schicht bildet, welche aus vielen kleinen, tröpfchenförmigen Kolonieen gebildet ist.

Fügt man zu einer Kultur in Traubenzuckerbouillon Kalkwasser, bis sie alkalisch wird, filtriert den Niederschlag des Phosphates, der dann den größten Teil der Bacillen mit sich fortreißt, und läßt das Filtrierte abdampfen, bis man einen syrupähnlichen Rest erhält, so erhält man nur durch das Mikroskop wahrnehmbare, nadelförmige Krystalle von milchsaurem Kalk. Es handelt sich also um einen Bacillus lactis acidi, der nichts mit dem Bacterium lactis aërogenes von Escherich zu thun hat, weil er in Traubenzuckerbouillon kein Gas entwickelt und weil er die Färbung nach der Gram'schen Methode aushält; dagegen zeigt er alle Eigentümlichkeiten des Bacillus lactis

acidi von Hueppe, wovon ich mich durch ein einfaches Kontrollexperiment überzeugen konnte:

Mit ein wenig an der Luft sauer gewordener Milch infizierte ich ein Reagenzglas essigsaurer Traubenzuckerbouillon reichlich und nach 24 Stunden übertrug ich diese in einfache Traubenzuckerbouillon; ich erhielt dadurch eine reine Kultur des gewöhnlichen Bacillus lactis acidi, welcher absolut keinen Unterschied von dem aus dem Kote isolierten zeigte. Diese Methode, den Bacillus lactis acidi zu isolieren, ist einfach und schnell und gewiß derjenigen von Beijerinck vorzuziehen, welche die Plattenkultur mit Traubenzuckergelatine und kohlensaurem Kalk bedingt.

II. Diplococcus acidophilus. Es ist ein eingekapselter Diplococcus, dessen einzelne, vollständig runde Kokken kleiner als die Coccus-Formen des oben beschriebenen Bacillus erscheinen; derselbe hat keine Neigung, sich zu Ketten zu vereinigen, in den alten Kulturen erscheint er in Haufen vereinigt; lanzettförmige wurden niemals bemerkt. Dieser Keim hält die Färbung nach der Gram'schen Methode aus; er entwickelt sich in der Temperatur des Thermostaten in Milchzuckerbouillon üppig, indem er die Bouillon durchsäuert, ohne Gas zu entwickeln. Die Milch gerinnt langsam in einem Zeitraume von 4—5 Tagen.

Die Entwickelung in den festen Nährmitteln ist ganz ähnlich derjenigen des gewöhnlichen Bacillus lactis acidi. Bei den Kulturen in Milchzuckerbouillon hat man die Milchsäure in Form von Krystallen von milchsaurem Kalk nachweisen können. Es handelt sich daher noch um ein Bacterium lactis acidi, welches sich von ersterem dadurch vollständig unterscheidet, daß es ein wirklicher Diplococcus ist; dieser Keim wurde von mir ein einziges Mal aus untersuchtem Kote isoliert.

Bacillus acidophilus filiformis.

Es ist dies ein sehr langer und dünner Bacillus, welcher dazu neigt, sich sowohl in flüssigen als auch in festen Substanzen zu biegsamen Fäden zu vereinigen. Sporenbildung war nicht festzustellen; er hält die Färbung nach der Gram'schen Methode aus. In einfacher Bouillon wächst er sehr schlecht; in 1-proz. Traubenzuckerbouillon entwickelt er sich bei der Temperatur des Thermostaten, indem er weißliche Flocken erzeugt, welche in der Bouillon schwebend bleiben oder auf den Boden des Probegläschens fallen, ohne daß die Bouillon selbst trübe wird; sie stellen sich als Bacillen heraus, welche zu biegsamen Fäden vereinigt und unter sich zusammengehäuft sind. Schüttelt man die Bouillon, so wird diese durch die Zersetzung jener Haufen gleichmäßig trübe. In der Traubenzuckerbouillon entwickelt unser Bacillus weder Säure noch Gas; die Milch gerinnt nicht. Auf dem gewöhnlichen Agar entwickelt er sich bei der Temperatur des Thermostaten innerhalb 24 Stunden, indem er kleine, durchsichtige, tröpfchenähnliche Kolonieen bildet. — Wirklich merkwürdig ist die Entwickelung der Kolonieen dieses Bacillus in der Plattenkultur in Gelatine, aus welcher er isoliert wurde. Es handelt sich um eine ca. 1 Monat alte Kultur. Die Gelatine ist nicht flüssig geworden. Mit bloßem Auge bemerkt man kleine, stecknadelkopfförmige, weißliche Kolonieen, ähnlich denjenigen des Bacillus lactis acidi. Mit dem Mikroskope für kleine Vergrößerungen betrachtet, erscheinen diese Kolonieen kohlenschwarz, einige davon sind

rund, andere mit geschnitztem Rande wie Blätter, und in der Mitte zeigen sie eine helle Zone mit symmetrischen Strahlenformen. Entfernt man mit dem Platindraht eine dieser Kolonieen, so erscheint dieselbe aus einer harten und zerbröckelbaren Substanz gebildet; zerdrückt man sie zwischen zwei Deckgläsern und untersucht man sie mikroskopisch, so ist man verwundert, anstatt Bacillen Haufen von Krystallen zu sehen; dieselben sind farblos, nadelförmig, und, obgleich losgelöst, erhalten sie noch die Strahlenform; in ihrer Mitte beobachtet man hier und da dünne und eher lange Bacillen. Wie erklärt sich diese merkwürdige Entwickelung? Daß die Bakterien fähig waren, Krystalle niederzuschlagen, war bekannt, daß sie aber fähig sind, Anhäufungen von Krystallen zu bilden, die vollständig symmetrisch geordnet sind, so daß sie für Kolonieen gewöhnlicher Keime gelten könnten, war mir ganz neu, und ich glaube, daß es noch niemals beschrieben worden ist! Die Natur der Krystalle festzustellen, ist mir nicht gelungen.

Der gewöhnliche Bacillus acidophilus.

Derselbe ist wahrscheinlich mit dem von Moro, Finkelstein etc. aus dem Kote der Neugeborenen isolierten identisch; er ist ein dünnes Stäbchen, ähnlich dem Diphtheriebacillus; oft ist er zu zweien vereinigt, manchmal bildet er kleine Fäden; er läßt sich nach der Gramschen Methode färben, wächst spärlich in gewöhnlicher Bouillon, üppig bei der Temperatur des Thermostaten in Traubenzuckerbouillon mit leichter Säurebildung, ohne jedoch Gas zu entwickeln. Er läßt die Milch nicht gerinnen. Er ist unbeweglich und giebt keinen Anlaß zur Sporenbildung. In einfacher Gelatine entwickelt er sich sehr schwer nach 7—8 Tagen, wobei er kleine, stecknadelkopfförmige Kolonieen bildet; mitunter entwickelt er sich gar nicht. — In den alten Kulturen nimmt er das Aussehen eines Fadens an; ich konnte jedoch niemals die von Rodella beschriebenen Verzweigungen beobachten, wie auch niemals die Kokkenformen, wie beim Bacillus lactis acidi.

Auf dem gewöhnlichen Agar entwickelt er sich innerhalb 24 Stunden, wobei er eine ganz dünne Schicht bildet.

Aus vorstehender Beschreibung geht hervor, daß die von uns isolierten 4 Keimarten, obgleich sie sich untereinander unterscheiden, doch gemeinsame Eigentümlichkeiten haben, und zwar diejenige, sich in essigsauerer Bouillon zu entwickeln und sich nach der Gram'schen Methode färben zu lassen, und die Neigung, sich in den gewöhnlichen festen Nährmitteln spärlich zu entwickeln.

Diese 4 Arten wurden, wie wir schon oben andeuteten, aus dem Kote von 20 Kranken, die an verschiedenen Krankheiten litten, isoliert. Für den Bacillus lactis acidi konnte, wie wir schließlich sehen werden, ein gewisser Zusammenhang zwischen seinem Vorhandensein im Kote und der Beschaffenheit des Magen- und Darmkanales festgestellt werden; das Gleiche kann nicht vom gewöhnlichen Bacillus acidophilus gesagt werden, welcher auch im Kote solcher Kranken gefunden wurde, die einen gesunden Magen- und Darmkanal hatten. Ueber die anderen 2 Arten können wir uns nicht äußern, weil der Diplococcus acidophilus ein einziges Mal aus dem Kote eines an Lungentuberkulose leidenden Kranken und der Bacillus filiformis ebenfalls nur 1mal von einem an Magenkrebs leidenden Kranken isoliert wurde.

Und nun seien mir noch einige Betrachtungen über Hueppe's Bacillus lactis acidi gestattet.

Soviel ich weiß, sind bisher im Kote des erwachsenen Menschen noch niemals Bacilli lactis acidi nachgewiesen worden. Nur im Kote der Neugeborenen entdeckte Escherich das Bacterium lactis aërogenes, welches übrigens im wahren Sinne des Wortes kein Bacillus lactis acidi ist, weil er mehr Essigsäure als Milchsäure entwickelt, so daß Baginsky ihn für einen Bacillus aceticus halten möchte. Dieser hat eine große Aehnlichkeit mit dem gewöhnlichen Bacillus lactis acidi, mit welchem man ihn leicht verwechseln könnte, wenn er sich nicht durch zwei charakteristische Merkmale auszeichnete: 1) Er hält die Färbung nach der Gram'schen Methode nicht aus; 2) er erzeugt mit der Gasentwickelung die Gärung des Traubenzuckers.

Die Thatsache, daß es mir nicht gelungen ist, das Bacterium lactis aërogenes aus dem Kote des erwachsenen Menschen mit essigsauerer Bouillon zu isolieren, läßt mich darauf schließen, daß er sich darin wenigstens sehr selten aufhält, denn die Annahme, daß ein Keim, der Essigsäure entwickeln kann, auch in essigsauerer Bouillon gedeiht wie der gewöhnliche Bacillus lactis acidi, ist logisch.

Weniger leicht zu verstehen ist es jedoch, wie keiner der Forscher, die sich mit säureliebenden Bacillen im Kote der Säuglinge beschäftigten, die Bacilli lactis acidi mit essigsauerer Bouillon isoliert hat, die doch acidophil sind. In der That, wenn man die Figuren der Arbeit von Rodella betrachtet, fällt sofort die große Aehnlichkeit in die Augen, die gewisse Formen mit denjenigen des gewöhnlichen Bacillus lactis acidi haben; und auch die Thatsache ist bemerkenswert, daß der von genanntem Forscher isolierte Bacillus die Milch gerinnen läßt, aber er erklärt die Gerinnung der Milch durch die Bildung von kleinen Mengen fetter Säuren und die Kokkenformen der Kulturen durch den großen Polymorphismus des säureliebenden Bacillus.

Der Bacillus lactis acidi von Hueppe soll nicht so selten im Kote des erwachsenen Menschen sich finden; ich habe ihn wiederholt aus dem Kote von 3 an Magenkrebs leidenden Kranken, sowie aus demjenigen von 3 anderen Patienten isoliert, die an mehr oder weniger schweren Magen- und Darmkrankheiten litten. Von diesen 6 Personen bekamen 2 vorzugsweise Milchnahrung, 3 eine gemischte Nahrung, während 1 seit über 1 Monate überhaupt keine Milch genossen hatte.

Es muß daher zugegeben werden, daß, wenn das Vorhandensein von Hueppe's Bacillus im Kote durch Milchnahrung begünstigt wird, es nicht notwendig von derselben bedingt wird; andererseits beweist die Thatsache, daß es mir nicht gelungen ist, den erwähnten Bacillus aus dem Kote von Kranken zu isolieren, die nur Milchnahrung erhielten, daß diese nicht genügt, um einen festen Anhaltspunkt zu haben, sondern daß wahrscheinlich eine besondere Beschaffenheit des Magen- und Darmkanales dazu gehört.

Jedenfalls ist zu bemerken, daß der Bacillus von Hueppe vorzugsweise im Kote von an Magenkrebs Leidenden von mir gefunden wurde, und vielleicht ist es nicht ohne Interesse, durch weitere Nachforschungen zu sehen, ob er sich nicht etwa fortwährend darin befindet.

Nachdruck verboten.

Ueber eine von einem atypischen Colibacillus veranlasste typhusähnliche Hausepidemie hydrischen Ursprunges.

[Aus dem hygienischen Laboratorium an der Universität zu Jassy.]

Von

a. o. Prof. **V. Sion**, Direktor des Laboratoriums. und Prof. **V. Negel**, Primärarzt.

(Fortsetzung.)

Die 7 Stunden post mortem aus der grauen Hirnsubstanz, aus dem Erweichungsherde des Gehirnes, aus dem Blute, der Endocardwucherung, der Pericard- und Pleuraflüssigkeit, der Leber, der Milz, den Nebennieren angestellten Kulturversuche ergaben in Reinkultur einen kurzen, beweglichen, nach Gram nicht färbbaren Bacillus. Nur aus den Bronchien wuchsen neben diesem Bacillus auch noch ein Streptococcus und das Friedländer'sche Bakterium, während die aus der Bauchspeicheldrüse, dem Thyroidkörper und den Mesenterialdrüsen beschickten Nährböden steril blieben.

Erst nach dem Ableben des Patienten N. J. erfuhren wir, daß in dem Hause, das von ihm und seiner Schwester A. R. bewohnt war, auch noch andere Kranke vorhanden waren. Unsere nächste Sorge war also, den Ort in Augenschein zu nehmen.

Wir fanden ein geradezu primitives Häuschen an dem äußersten Ende der Stadt, woselbst in zwei kleinen niedrigen und finsteren Zimmern 6 Menschenwesen lebten: Die beiden Patienten, die im Krankenhause Aufnahme fanden, Bruder und Schwester, der Gatte der letzteren und deren 3 Kinder. Sämtliche Hausbewohner, der Erwachsene und die 3 Kinder, waren krank und standen in Behandlung des Stadtarztes. Die Diagnose lautete: Abdominaltyphus und war demgemäß an die städtische Gesundheitsbehörde gemeldet.

Wir gelangten ziemlich spät zu diesen Patienten, teilweise waren dieselben am Ende des Krankheitsprozesses. Wir mußten uns also mit den Aussagen des übrigens intelligenten Erwachsenen und mit den Untersuchungen, die wir anzustellen imstande waren, begnügen.

Patient N. R., Vater der Kinder, 40 Jahre alt, von großem, athletischem Bau, aber geschwächt, erzählt uns, daß er an demselben Tage wie seine ins Krankenhaus geschaffte Gattin A. R. erkrankt sei, und zwar am 26. November 1901, 2 Tage nach der Erkrankung seines Schwagers N. J. Schon 4—5 Tage zuvor litt Patient an Kopfschmerzen und Nasenbluten. Während der ganzen Krankheitsdauer klagte Patient über heftige Kopfschmerzen, Mattigkeit und hatte Delirien. Der behandelnde Arzt teilt uns mit, daß er imstande war, eine generalisierte Typhusroseola auf der ganzen Vorderseite des Thorax und des Abdomens zu beobachten, die aber nur 4 Tage gedauert hat. Pat. war anfänglich verstopft, während später 3—4 diarrhöische Stühle eintraten. Als wir Patient aufsuchten, befand sich derselbe (16. Dezember) am Ende der 3. Krankheitswoche, zeigte aber noch morgens 36,8—37,5 ° und abends 38,2—38,5 °. Die Serumprobe war positiv.

Die 3 Kinder erkrankten sämtlich in dem Zeitraume vom 26. November bis zum 1. Dezember, ohne daß wir in Erfahrung bringen konnten, ob merkbare Prodrome vorhanden waren. Sie boten dieselben allgemeinen Erscheinungen wie die Erwachsenen, nur daß dieselben, vornehmlich die Darmerscheinungen, ausgesprochener waren. Sie hatten von Anfang an Diarrhöe, 5—7 Ausleerungen im Tage. Die bronchopulmonalen Symptome waren ebenfalls sehr ausgeprägt: Während der ganzen Krankheitsdauer husteten die Kinder sehr stark.

Das Kind G. R., 4-jährig, hatte, als wir es sahen, morgens 37,5 °, abends 38,7 ° und täglich nur 1—2 weiche, beinahe flüssige und flockige, gelbe Stühle.

Das Kind V. R., 6-jährig, hat noch immer erhöhte Temperatur, morgens 37,5°, abends 38,6°, keine Diarrhöe, hustet noch und hat lufthaltigen, schleimig-eiterigen Auswurf. Die Atmungsorgane dieses Patienten waren besonders stark ergriffen.

Das Kind T. R., 8-jährig, befindet sich in der Rekonvalescenz, ist seit 3 Tagen ganz fieberlos.

In sämtlichen Fällen war die Serumprobe positiv, selbst bei dem letzten, dessen Temperatur nun normal war.

Das, was wir bei dem verstorbenen N. J. und bei dessen Schwester A. R. beobachtet hatten, ließ uns unbefriedigt, und entschlossen wir uns, umgehend das Blut bakteriologisch zu untersuchen. Im Folgenden schildern wir die Art, wie wir verfuhren, und die Resultate, die wir erhielten:

Dem Patienten N. R. entnahmen wir aus der Vena mediana cubiti mit allen nötigen Kautelen 15 ccm Blut. Einen Teil dieses Blutes verteilten wir in 20 Kölbchen, die je 50 ccm Bouillon enthielten, während der übrige Teil zur Impfung von 20 Röhren mit flüssig gemachtem Agar diente, die dann in Petri-Schalen gegossen wurden. Nach 36—48-stündigem Verweilen im Brütofen bei 37° trübte sich die Fleischbrühe in 3 Kolben, während von den 20 Schalen nur in zweien, in der ersten 2 und in der zweiten 3 gleiche runde, körnige, gelbliche, ins Grüne spielende, bis 2 mm messende Kolonieen auftraten. Alle 5 Kolonieen erwiesen sich als von einem und demselben kurzen, beweglichen, Gram-feindlichen Bacillus gebildet. Derselbe Bacillus trübte den Inhalt der 3 Kolben mit Bouillon; bei der Ueberimpfung auf Agar und Gelatineplatten konnte ein anderer Mikroorganismus nicht nachgewiesen werden.

Dem Kinde G. R. entnahmen wir 10 ccm Blut aus der Vena mediana cubiti, das auf 20 Kolben mit je 50 ccm Bouillon verteilt wurde. Nach 48 Stunden waren 2 Kolben getrübt. Mittels zahlreicher Ueberpflanzungen auf Platten fanden wir einen einzigen kurzen, beweglichen, Gram-feindlichen Bacillus.

Dem Kinde V. R. wird in derselben Weise Blut entnommen und verwendet. 3 Kolben werden getrübt, und zwar von demselben kurzen, beweglichen, Gram-feindlichen Bacillus. Aus dem Auswurfe dieses Kindes züchteten wir den Pneumococcus, den Staphylococcus albus und einen kurzen, beweglichen, Gram-feindlichen Bacillus, denselben, den wir im Blute gefunden haben.

Ebenso werden dem Kinde T. R. 10 ccm Blut entnommen und verwendet. Sämtliche Kolben blieben nach 6-tägigem Verweilen im Brütofen bei 37° steril.

Wir hatten also in dieser Hausepidemie 6 Kranke, bei denen wir 5 Bakterien züchten konnten: 4 aus dem Blute von 4 Kranken und einen von der Leiche des einzigen Kranken, der hinweggerafft wurde. Der 5. Patient, das Kind V. R., hatte steriles Blut aus den oben geschilderten Gründen. Leider gestatteten es uns die Verhältnisse nicht, auch den 6. Kranken, die Patientin A. R., zu untersuchen, die mit ihrem Bruder im Krankenhause Aufnahme fand, und deren Serum, wie mitgeteilt wurde, eine positive Widal'sche Probe lieferte. Diese Patientin war gravid im 5. Monate, sehr nervös und befand sich in äußerst reizbarem Zustande, so daß wir weder einen Aderlaß noch eine Milzpunktion machen konnten. Im übrigen verlief ihr Leiden wie ein schwerer Abdominaltyphus, aber ohne Komplikationen. Patientin verließ das Krankenhaus nach 4-wöchentlichem Aufenthalte vollkommen geheilt und unter fortdauernder Schwangerschaft.

Bevor wir aber noch diese Resultate kannten, entschlossen wir uns, sobald festgestellt wurde, daß diese sämtlichen 6 Bewohner eines Hauses mit gleichen klinischen Erscheinungen erkrankten, nach den Ursachen dieser Hausepidemie zu forschen. Die Art, wie die Krankheit auftrat und verlief, die Thatsache, daß sämtliche Patienten mit ähnlichen Darmerscheinungen, allein stärker ausgesprochen bei den Kindern, die Läsion der akuten Enteritis, die wir bei dem verstorbenen Patienten feststellten — dies alles veranlaßte uns, an eine alimentäre Infektion zu denken.

Allein wir gelangten, wie wir bereits erwähnt haben, ziemlich spät zu den zu Hause verbliebenen Patienten, so daß von den Nahrungsmitteln, die eventuell zu beschuldigen gewesen wären, nur noch das Wasser einer Untersuchung unterworfen werden konnte. Wir werden weiter unten sehen, inwieweit unsere Bemühungen von Erfolg gekrönt waren.

Wir glauben, daß in diesem Ideengange es nicht überflüssig wäre, über die örtlichen Umstände einige Aufschlüsse zu geben. Wie wir bereits oben erwähnt haben, befand sich die Wohnung der 6 Patienten

hart vor dem Stadtthor. Es war ein niedriges Bauernhäuschen, bestehend aus 2 Zimmern, zwischen denen sich ein schmaler Verbindungsraum befand. Der freie Hofraum beträgt etwa 7:12 m. Er grenzt auf der einen Seite an die ungepflasterte Straße, hinten an einen Nachbarhof und an beiden anderen Seiten an freie, ebene Plätze, die den Tieren der Stadtbewohner zur Weide dienen. Auf der freien Ebene, in der Nähe der Wohnungen, sind Gruben vorhanden, die sich mit Regen- und Abflußwässern füllen und in denselben stagnieren. Derartige Gruben, die den Schweinen und Gänsen zum Zeitvertreib dienen, sind, wie wir uns persönlich überzeugen konnten, auch in dem erwähnten Hofe vorhanden. Dicht an dem Häuschen befindet sich ein aus Brettern roh zusammengezimmerter Abort, dessen Grube keine Schutzwände aufweist. In einer Entfernung von 2 m befindet sich ein Stall, dessen Wände aus Ruten zusammengeflochten sind, woselbst eine Kuh, Schweine und Geflügel wohnen; der Fußboden ist nicht geschützt. Etwa 3 m weit vom Stalle befindet sich der Brunnen.

Von der Boden- bis zur Wasseroberfläche messen wir 4 m, während die Wassersäule $2^1/_2$ m beträgt. An der Oberfläche ist der Brunnen folgendermaßen eingerichtet: Ein Erdhügel, etwa um 1 m höher als das umgebende Terrain, unvollkommen gepflastert, hat in seiner Mitte die Oeffnung des Brunnens. Dieselbe ist durch eine kreisrunde Steinmasse vervollständigt, die 1,20 m im Durchmesser mißt, 40 cm stark ist und in deren Mitte sich eine 80 cm im Durchmesser fassende Oeffnung befindet. Dieser Stein ist unmittelbar auf den Erdhügel aufgesetzt, in demselben 4—5 cm vergraben.

Die innere Wandung des Brunnens besteht aus flachen Sandsteinen, die aufeinandergelagert sind, ohne durch einen Zwischenkitt miteinander verbunden zu sein. Zwischen diesen Steinen sind also Räume vorhanden, spaltförmig bis fingerweit, in die die Finger bis zum Metacarpus eingeführt werden können. Etwa in einer Tiefe von 70—80 cm von der Oberfläche des umgebenden Terrains bemerkt man an den Brunnenwänden bräunlich-schwarze Streifen, die von Schmutzablagerungen gebildet sind, von den Steinen abgekratzt werden können und die mit Unterbrechungen bis zur Wasseroberfläche verfolgt werden können.

Die erkrankte Familie verschafft sich das nötige Wasser aus diesem Brunnen. Derselbe hat kein Schutzdach; das Wasser wird mittels eines hölzernen Hakens nach oben befördert, und zwar indem an diesem Haken irgend ein Wassergefäß angehängt wird. Dicht an dem den Brunnen umgebenden Hügel ist eine Aushöhlung des Bodens vorhanden, wo das Wasser stagniert, sowohl das sich vom Hofe ansammelnde wie dasjenige, welches beim Wasserschöpfen verschüttet wird. Für gewöhnlich dient dieser Brunnen nur zum Gebrauche dieser Familie, denn am anderen Ende der Straße, an die dieses Häuschen grenzt und woselbst zwei Reihen gleichförmiger Häuschen vorhanden sind, die von teilweise erdbautreibenden Arbeitern bewohnt sind, ist ein sich in etwas besserer Verfassung befindlicher öffentlicher Brunnen vorhanden, der sämtlichen Einwohnern dieser Straße das nötige Wasser liefert (s. Tab. 1. p. 584/585).

Sind wir dessen eingedenk, daß, außer dem Meerwasser und den Mineralwässern, ein natürliches Wasser, um als rein angesehen zu werden, nicht mehr als 2—3 Chlor, 8—10 Schwefelsäure, 0,5—1,5 Salpetersäure, in Milligramm pro 100 ccm gerechnet, enthalten darf, daß es nicht mehr als 50 mg festen Rückstand in 100 ccm nach Verdampfung bei 110° haben darf, daß die in 100 ccm enthaltene or-

Tabelle

Datum der Untersuchung	Temperatur		Klarheit und Farbe	Geruch bei 50° C	Geschmack bei 20° C	Fester Rückstand n. Verdampfung bei 110° C
	der Luft	des Wassers				
17. Dez. 1901	+ 4° C	+ 10° C	Schwach opalisierend. Farblos	0	0	193

ganische Materie nicht mehr als 0,8—1 mg permangansaueres Kali reduzieren darf, daß die salpetrige Säure und das Ammoniak abwesend oder doch nur in nicht dosierbaren Mengen vorhanden sein darf — wenn wir alles dieses im Auge behalten und es mit der beistehenden Tabelle 1 vergleichen, so können wir uns einen Begriff machen, wie sehr das Wasser schmutzig war. Insbesondere das Chlor, die ungeheuere Menge salpetrige Säure und Ammoniak liefern den Beweis, daß dieses Wasser organische Abflüsse aufnahm und daß dieselben aus der menschlichen und tierischen Wirtschaft frisch kamen und noch nicht genug umgewandelt waren.

Was nun die Bakteriologie dieses Wassers anbetrifft, so haben wir es unterlassen, eine genaue quantitative und qualitative Bestimmung der Bakterienflora zu unternehmen. Wir sind nämlich der Ansicht, daß ein offenes Wasser, wie es dieses war, stets der Möglichkeit ausgesetzt ist, Infiltrationen von der Oberfläche aus zu empfangen. Hier war dies, wie die Lokalbesichtigung und die chemische Analyse ergab, thatsächlich der Fall und die genaue bakteriologische Untersuchung mußte als überflüssig erachtet werden. In dieser Hinsicht können wir nur den von Hygienikern, wie Gärtner[1]) und Gruber[2]) aufgestellten Prinzipien folgen. Auf welchen von den Bakteriologen aufgestellten Standpunkt wir uns gestellt hätten — sei es in Betreff der Zahl der Mikroorganismen, sei es in Bezug auf deren Varietät, die Eigenschaft ihrer Arten etc. — die Schlußfolgerung müßte für uns dieselbe sein. Selbst wenn die bakteriologische Untersuchung günstig ausgefallen wäre. hätten wir doch das Wasser dieses Brunnens vom hygienischen Standpunkte aus als schlecht verurteilen müssen, lagen doch die Verhältnisse derart, daß es jeden Augenblick aus dem Digestionstraktus des Menschen und der Tiere stammende Mikroorganismen aufnehmen konnte.

Infolgedessen waren unserer Untersuchung engere Grenzen gesteckt; wir wollten nur feststellen, ob das Wasser Typhusbacillen enthielt oder nicht. Dann aber handelt es sich darum, zu erforschen, worauf sich die Erkrankung dieser Familie, die sich bekanntlich dieses Brunnenwassers bediente, zurückführen ließe.

Der erste Zweck, den wir verfolgten, war nicht erreicht worden. Im Ganzen beschickten wir 112 Petri-Schalen mit verschiedenen Nährsubstraten: Gewöhnliche peptonisierte Gelatine, in verschiedenen Verhältnissen mit dem Wasser vermischt; Elsner'sche Gelatine unmittelbar

1) Gärtner, Ueber Methoden, die Infektion eines Wassers zu beurteilen. (Festschrift zur 100-jährigen Stiftungsfeier des medizinisch-chirurgischen Friedrich-Wilhelm-Institutes.)

2) Gruber, Die Grundlagen der hygienischen Beurteilung des Wassers. (Deutsche Vierteljahrsschr. f. öffentl. Gesundheitspfl. Bd. XXV.)

1.

Chlor (in Milligramm), titriert nach Mohr	Schwefelsäure (in Milligr.), titriert nach Wildenstein	Salpetersäure (in Milligr.), titriert nach Max Trommsdorf	Salpetrige Säure (in Milligramm), titriert nach Trommsdorf	Ammoniak (in Milligramm), titriert nach Wanklyn-Chapmann		Kaliumpermanganat reduziert mittels organischer Materie. Kubel Tiemann
				Frei	Albuminoid	
3,99	12,16	0,481	0,48	0,65	0,26	3,75

mit Wasser beschickt oder nach vorangehender Behandlung mit Karbol- und Salzsäure (Parietti); gewöhnliche Gelatine nach vorangehender Behandlung des Wassers nach der Methode von Péré; sogenannte differentiale Gelatine von Remy; Piorkowski'sche Gelatine, beschickt mit dem durch Sedimentierung und Centrifugierung einer größeren Wassermenge erhaltenen Niederschlage oder mit dem Schlamme aus dem Brunnenboden. Nicht eine einzige Platte zeigte eine Kolonie, die mittels Identifizierungsuntersuchungen als Eberth'sche Bacillen enthaltend anerkannt worden wäre.

Die Forschung nach dem Eberth'schen Bacillus lieferte uns nur den Beweis, daß in diesem Wasser, wovon wir bereits überzeugt waren, eine reiche Bakterienflora enthalten ist. Unter den zahlreichen Mikroorganismen, die auf Grund der oben gegebenen Erklärung nicht weiter verfolgt wurden, fanden wir verflüssigende Proteï, chromogene Bakterien, Vibrionen, Kokken, einen Bacillus, der sämtliche Charaktere des Milzbrandbacillus, außer dessen Pathogenität, zeigte mehrere Coli-Typen, deren Vergleich mit Coli aus dem Laboratorium, mit Typhusbacillen und mit den aus dem Blute der Kranken isolierten Bakterien für den von uns verfolgten Zweck nicht von Nutzen gewesen ist.

Allein wir hatten das Glück, auf gewöhnlicher Gelatine, die mit Mengen von den oben beschriebenen Schmutzstreifen an den Wänden des Brunnens beschickt wurde, einen Bacillus zu züchten, der, wie es scheint, es uns gestattete, das letzte Glied der Kette von Thatsachen zu schließen, das die oben beschriebene Epidemie darstellt. Es war dies also das 6. Bakterium, dem wir unsere Aufmerksamkeit zuwandten.

Wir werden uns jetzt mit der Charakterisierung dieser Bakterien befassen, die in synoptischer Weise auf Tabelle 2 wiedergegeben sind. Was in der Tabelle als Bakterium No. 1, N. J. bezeichnet ist, ist aus dem Blute des Patienten N. J. isoliert, No. 2, N. J. aus der Leiche desselben Individuums, No. 3, N. R. aus dem Blute des 40-jährigen erwachsenen Individuums, No. 4, G. R. aus dem Blute des 4-jährigen Kindes G. R., No. 5, V. R. aus dem Blute des 5-jährigen Kindes V. R. und No. 6, Ap. aus dem Schmutze der Brunnenwände (s. Tab. 2. p. 586/587).

Die Bestimmung dieser Bakterien geschah durch Vergleich miteinander, andererseits aber mit verschiedenen Coli- und Typhusstämmen. Zu diesem Zwecke verwendeten wir 6 Typhusstämme und 58 Coli-Bacillen. Die Typhusbacillen waren isoliert: 2 aus dem Blute Typhöser intra vitam, 2 aus den Stuhlentleerungen und 2 aus der Milz von Typhusleichen. Die Coli-Stämme waren aus den verschiedensten Medien isoliert, menschlichen und tierischen Leichen, Dejektionen, Harn, in Fäulnis übergehendem Fleisch, altem Käse,

Tabelle

	Größe, Form und Färbbarkeit	Beweglichkeit und Geißeln	Wachstum: Gelatineplatte 10 %	Piorkowskische Gelatine	Kartoffelscheiben	Agar mit Glukose 2 %
Epidemiebac. No. 1, N. J.	Kurzes Stäbchen, selten längere Fäden. Enden abgerundet. Bipolare Färbung. Gram negativ	Mittlere oder sehr energische Mobilität. Sehr empfindlich bei Temperatur. 4—6 Geißeln, selten 8	Kolonieen n. 48 Stunden. Durchsicht., anfänglich bläul., nach weiteren 48 Stdn. gelbl. Oberflächl. blattähnl. Kolon. etwas diffus. Umfang 4 mm	Seltene flagellierte Kolon. Oberflächl. amöbenförmige Kolonieen	Feine, trockene, glanzlose, fein granulierte, pergamentierte, relieflose, braungelbliche Schicht	Schwach gaserzeugend
Epidemiebac. No. 2, N. J.	Wie 1	Wie 1	Wie 1	Wie 1	Wie 1	Wie 1
Epidemiebac. No. 3, N. R.	Wie 1	Wie 1	Nach mehrer. Tagen werd. die Kolon. größer, bis 5—6 mm, selt. 7—8 mm. Sonst wie 1	Amöbenförmige Kolon. seltener als bei 1. Sonst identisch	Aschgraue Schicht, sonst wie b. 1	Wie 1
Epidemiebac. No. 4, G. R.	Wie 1	Wie 1	Wie 3	Zahlreichere amöbenförmige Kolon. als bei 1. Sonst identisch	Wie 1 u. 3	Wie 1
Epidemiebac. No. 5, V. R.	Wie 1	Wie 1	Wie 3 u. 4	Wie 4	Wie 4	Wie 1
Epidemiebac. No. 6, Ap.	Wie 1	Wie 1	Die Kolonieen erscheinen n. 24 Stunden. Sonst wie 1	Wie 3. Die flagellierten Kolon. weniger gut charakterisiert	Eine etw. reichere, feuchtere Schicht, aber doch nie so üppig wie bei Coli	Wie 1

Erde, Wasser etc. Aus Raumersparnis haben wir in Tabelle 2 nur diejenigen Charaktereigenschaften angeführt, die uns für diese Studie interessieren. In der darauffolgenden Diskussion werden wir uns fortwährend auf den einen oder anderen Bacillus beziehen, die uns zum Vergleiche gedient haben, insbesondere wenn wir es für nötig erachten, damit die Kennzeichen unserer Bakterien in Erscheinung treten, wenn wir deren Wert der verschiedenen verwendeten Differenzierungsmethoden besprechen werden.

Aus dem Studium der Tabelle 2 ist ersichtlich, daß sämtliche 6 Bakterien in mancher Hinsicht identisch sind, obwohl sie in anderer Hinsicht abweichende Charaktere darbieten. Wir werden im Folgenden diese gemeinsamen und differentiellen Eigenschaften analysieren und uns über deren Wert zu informieren suchen. Diese Besprechung wird den Beweis liefern, ob die Ueberschrift dieser Arbeit „Ueber eine von

2.

Laktosewasser in Gärungskolben	Milch	Lackmusserum Petruschky's	peptonisiertes Wasser	Capaldi-Proskauer's mannithaltig. Nährsubstanz	Capaldi-Proskauer's mineralischer Nährsubstanz	Agarneutralrot in Schüttelkultur	Agarplatten mit sauerem Fuchsin
auf							
Fermentiert nicht	Die Nährsubstanz verdickt sich syrupartig	Violett. Alkalinität 2,5 %	Mäßige gleichförmige Trübung. Kein Indol	Alkalisch. Neutral nach 7—8 Tagen	Kaum bemerkbares Wachstum	Aeußerst geringe Entfärbng. ohne Fluorescenz	Schmaler, kaum rosiger Hof rings um die Kolonieen
Wie 1	Wie 1	Wie 1	Wie 1	Wie 1	Wie 1	Wie 1	Wie 1
Wie 1	Wie 1	Violett. Alkalinität 1,5 %	Wie 1	Wie 1	Wie 1	Fast gänzlich entfärbt und schwach fluorescierend	Breitere und tiefer gefärbte Aureolen rings um die Kol. als bei 1
Wie 1	Wie 1	Wie 3	Wie 1	Wie 1	Wie 1	Wie 3	Wie 3
Wie 1	Wie 1	Wie 3 u. 4	Wie 1	Wie 1	Wie 1	Wie 3 u. 4	Wie 3 u. 4
Wie 1	Wie 1, isoliert nur ein wenig Serum	Violett. Alkalinität 1 %	Wie 1	Wie 1	Wie 1	Vollständige Entfärbung mit tiefer Fluorescenz	Rings um die Kolonieen ein breiter roter Hof

einem Bacillus veranlaßte Epidemie ...“ gerechtfertigt ist oder ob die 6 isolierten Bakterien voneinander verschieden sind.

Andererseits ist aus derselben Tabelle ersichtlich, daß die Bakterien, die wir zu erforschen suchen, einige Eigenschaften darbieten, die an den Typhusbacillus gemahnen, daß sie aber trotzdem von diesem grundverschieden sind und sich umgekehrt eher dem Coli nähern. Außerdem bemerkt man, daß neben wesentlichen Coli-Eigenschaften noch andere vorgefunden werden, die für gewöhnlich beim Coli nicht angetroffen werden. Wir werden den Wert auch dieser Charaktere besprechen und werden ersehen, ob wir berechtigt waren, in der Ueberschrift von einem Colibacillus zu sprechen, oder ob wir jenen Autoren, die derartige Bakterien in neue Gruppen einreihen, hätten nachahmen müssen.

Was nun die Form, Größe und Färbbarkeit anbetrifft, so konnten wir bei den 6 isolierten Bakterien keinen Unterschied feststellen. Alle

lassen sich mit wässerigen Anilinfarblösungen tingieren. Die Färbung ist intensiv genug, wenn eine mit Kali oder Natron oder Karbolsäure gebeizte Lösung verwendet wird; einfache Lösungen geben etwas blasse Färbung. Mit schwachen Farblösungen, die aber längere Zeit einwirken, erzielt man eine bipolare Färbung des Bakteriumkörpers. Diese Erscheinung ist ausgesprochener und allgemeiner, wenn die Bakterien auf Kartoffeln gezüchtet waren. Alle lassen sich ebenso leicht entfärben, insbesondere wenn Jod und Alkohol als Entfärbungsmittel verwendet wird. Die Dimensionen dieser Bakterien schwanken nur innerhalb enger Grenzen. Für gewöhnlich ist die Länge 1—3 μ, selten sieht man längere Fäden bis 9—10 μ. Die Dicke schwankt zwischen 0,4—0,7 μ; allein es giebt auch einige wenige Exemplare, die 0,9 μ fassen. Diese Verhältnisse sind ohne Unterschied bei sämtlichen Kulturen der 6 Bakterienstämme anzutreffen. Die Stäbchen, die diese Form und Dimension aufweisen, haben vollkommen abgerundete Enden.

Aus der Litteratur ist uns bekannt, welcher Wert der Beweglichkeit zuerkannt wird, wenn es sich darum handelt, Coli vom Typhusbacillus zu unterscheiden, und haben wir dieser Eigenschaft unsere größte Aufmerksamkeit zugewendet. Wir untersuchten die Beweglichkeit nach dem klassischen Verfahren, indem wir im hängenden Tropfen die lebende Kultur im flüssigen Medium untersuchten, und zwar war die Kultur nicht älter als 6—12 Stunden. Außerdem suchten wir dies durch die Färbung der Geißeln nach dem Loeffler'schen Verfahren zu kontrollieren. Die Geißelfärbungsmethode dieses Gelehrten hat uns immer die schönsten Resultate geliefert.

Wir können also die Beweglichkeit unserer Bakterien schildern, ohne daß wir zwischen den einen und den anderen einen Unterschied feststellen können. Ist die Kultur frisch genug, so sind sämtliche Individuen beweglich. Betrachtet man dieselben längere Zeit, so überzeugt man sich, daß sie sich wirklich von Ort zu Ort weiter bewegen. Verharren wir bei der Klassifikation, die wir für unsere Orientierung angenommen haben betreffend den Grad der Beweglichkeit der verschiedenen Bakterien, die uns zum Vergleiche gedient haben, so charakterisieren wir die Mobilität unserer Bakterien als mittelmäßig, denn, wenn auch alle Individuen örtlich ihre Stellung wechseln, so ist doch die Weite dieser Beweglichkeit im allgemeinen gering. Dies trifft für die meisten, aber nicht für alle Individuen zu. Etwa der 4. Teil derselben zeigt äußerst starke Beweglichkeit, deren Weite den Durchmesser eines mikroskopischen Gesichtsfeldes übersteigt. Diese stark beweglichen Individuen durchwandern pfeilgeschwind, sich schlängelnd oder drehend das gesamte Gesichtsfeld. Die Beweglichkeit dieser letzten Individuen ist, was deren Intensität betrifft, nicht von der der 6 Typhusstämme, die zum Vergleiche gedient haben und die sämtlich als sehr beweglich bezeichnet waren, zu unterscheiden. Wohl haben einige Bakteriologen sehr bewegliche Coli-Typen geschildert, die den Typhusbacillen an Beweglichkeit nichts nachzugeben hatten. Haben wir doch in keinem unserer 58 Coli-Stämme, die zum Vergleiche gedient hatten und von denen einige energische Mobilität aufweisen, solch intensive Beweglichkeit angetroffen, wie bei unseren 6 Typhusstämmen und bei den Mikroorganismen, die wir hier besprechen. Durch diese Eigenschaft der stark ausgesprochenen Beweglichkeit, die aber, wie bemerkt, nur teilweise auftritt, nähern sich unsere Bakterien, die wir hier charakterisieren wollen, viel eher dem Typhusbacillus.

Allein bevor wir die Geißeln, die ja das materielle und ursächliche Substrat der Mobilität darstellen, morphologisch untersuchen, haben wir es versucht, diese Eigenschaft noch weiter im hängenden Tropfen zu prüfen. Zu diesem Zwecke suchten wir uns zu überzeugen, ob und inwieweit die Temperatur die Beweglichkeit unserer Bakterien zu beeinflussen vermag. Bekanntlich unterliegt oft die Beweglichkeit dem Temperatureinflusse, und wissen wir, daß viele Bakterien, die bei Körpertemperatur sehr beweglich sind, weniger beweglich oder gar immobil werden, wenn sie bei niederer Temperatur gezüchtet werden. Wir wollten feststellen, ob der Temperaturwechsel, den wir vergleichsweise an unseren sämtlichen Mikrobien und an dem Eberth'schen Bacillus studiert haben, nicht irgend einen Unterschied zu Tage fördern würde. Wir waren thatsächlich so glücklich, auf diese Weise einen Unterschied festzustellen, der uns nennenswert erscheint.

Wir verfuhren in folgender Weise: Die Bouillonkulturen wurden, nachdem sie 6—8 Stunden im Brütofen bei 37° verharrt, in einen dunklen Raum (18—20°) gestellt. Nach verschieden langer Dauer dieses Verweilens wurde die Beweglichkeit im hängenden Tropfen geprüft. Der Unterschied war sehr prägnant. Nach 2 Stunden konnten wir bei unseren Bakterien nicht mehr jene weiten und energischen Bewegungen beobachten, die wir vorhin beschrieben haben; sämtliche Individuen bewegten sich diesmal nur langsam und beschränkt und die Beweglichkeit wurde immer träger. Nach 6 Stunden bewegen sich die Bakterien, ohne die von ihnen eingenommene Stelle merklich zu wechseln, und nach 12 Stunden sind sie ganz immobil und bilden Gruppen von der Größe eines mikroskopischen Gesichtsfeldes.

Ganz anders bei dem Typhusbacillus. Die Beweglichkeit unserer sämtlichen 6 Stämme ist bedeutend weniger von dem Temperaturwechsel beeinflußt. Nach 6, selbst nach 12 Stunden langem Verweilen bei einer Temperatur von 18—20° ist die Schnelligkeit der Beweglichkeit fast gar nicht verändert; selbst nach 24 Stunden sind die Bewegungen noch energisch genug und erst nach längerem Verweilen beginnt deren Energie zu sinken. Allein dies Sinken findet nur langsam statt, so daß selbst nach mehreren Tagen, wenn die Kultur bereits sichtbare Haufen aufweist, im hängenden Tropfen doch bewegliche, und zwar recht energisch bewegliche Individuen beobachtet werden.

Auch auf den nach der Loeffler'schen Methode gefärbten Präparaten ist ein erkennbarer Unterschied zwischen unseren Bakterien und dem Eberth'schen Bacillus vorhanden. In erster Reihe betrifft dies die Zahl der Geißeln. Wie aus der Tabelle 2 ersichtlich ist, fanden wir nie mehr als 8 Geißeln gruppiert an beiden Enden, so daß der mittlere Teil des Bacillenkörpers stets geißelfrei ist, und für gewöhnlich ist diese Maximalzahl der Geißeln nur selten. Außerdem lassen sich diese Formationen schwerer färben als die des Typhusbacillus, sie sind kürzer, besonders aber dünner, zarter. Diese Eigenschaften sind wesentlich ein Charakteristikum der Bakterien aus der Coli-Gruppe.

Wir haben bereits oben erwähnt, daß die niedere Temperatur sehr rasch die Beweglichkeit unserer Bakterien beeinflußt. Wir versuchten daher festzustellen, ob diesen dynamischen Modifikationen auch irgend eine statische Veränderung entspricht, d. h. wir wollten uns darüber klar werden, ob die Schwächung oder das Aufhören der Mobilität durch eine numerische oder morphotische Modifikation der Bakteriengeißeln veranlaßt ist. Selbstverständlich benutzten wir zu diesem Zwecke frische

Agarkulturen. Wir fixierten auf 8 Stunden das Alter der Kulturen, an denen wir die Versuche vornahmen. Um aber den von uns verfolgten Vergleich anzustellen, verwendeten wir Mikrobien, die volle 8 Stunden bei 37° verweilten, und andere, die nur 6 Stunden bei 37° und 2 Stunden bei 18—20° verharrten. Der Unterschied war merklich. Die Zahl der Geißeln war dieselbe, allein bei letzteren waren sie kürzer und dünner. Dieses Sinken des Geißelumfanges ist aber nicht merklich. Es ist nur scheinbar und darauf zurückzuführen, daß ein Teil der Substanz dieser Formationen unter dem Einflusse der milderen Temperatur eine chemische Veränderung ihrer Komposition erlitten hat, die es nicht mehr gestattet, daß die Farbstoffe sich fixieren. Denn in der Umgebung der gut gefärbten Geißelteile bemerkt man eine sehr feine, sehr blasse oder ganz farblose Zone; ebenso endigt das freie Ende der Geißel in eine ungefärbte Zone, die aber schattenähnlich sichtbar ist. Wären diese Teile aus der Umgebung und den Enden der Geißeln gefärbt, so hätten wir genau dieselben Dimensionen, wie bei jenen, die volle 8 Stunden bei 37° verweilten. Diese Verringerung des färbbaren Geißelumfanges ist noch deutlicher bei jenen Bakterien, die 4—5—6 Stunden bei 18° gestanden haben. Verweilen sie 12 Stunden bei dieser Temperatur, so lassen sich die Geißeln überhaupt nicht mehr färben.

Auf diesem Wege konnten wir keinen Vergleich anstellen zwischen den Bakterien, die unserer Abhandlung zu Grunde liegen, und dem Typhusbacillus, da bei diesem letzteren die Färbbarkeit der Geißeln auf Agarkulturen viel früher schwindet als die Stockung der Beweglichkeit in Bouillonkulturen.

Wir erachten es aber trotzdem für wichtig, diese Beobachtung an unseren Bakterien zu erwähnen. Denn, wenn dies vielleicht nicht notwendig ist von dem besonderen Standpunkte aus, der uns hier interessiert, und zwar betreffs der Bestimmung der genauen Unterscheidungsmerkmale der betreffenden Bakterien, so scheint es uns doch, daß es von allgemeinen Gesichtspunkten aus recht wichtig ist. Es scheint dies den Beweis zu bringen, daß nicht die Zahl der Geißeln, sondern deren Größe, deren Stärke, vielleicht deren chemische Zusammensetzung die Energie der Bewegungen bedingt. Dies würde mit dem übereinstimmen, was wir von anderen Bakterien wissen, so vom Choleravibrio, der sehr energische Bewegungen besitzt und trotzdem oft nur eine einzige Geißel aufweist.

Es sind noch andere 4 Charaktere vorhanden, die zu Gunsten der Einheit sämtlicher 6 von uns isolierten Bakterien plaidierten. Es ist dies die Art, wie sie die Glukose-, die Laktose-, die Mannit- und die Eiweißmoleküle beeinflussen. Im Folgenden wollen wir diese Charaktere und einige Eigentümlichkeiten, die unsere Bakterien bieten, schildern:

Das wertvollste Mittel zur Differenzierung des Eberth'schen Bacillus vom Colibacillus ist wohl die Eigenschaft des letzteren, Glukose in Gärung zu bringen. Wie allgemein angenommen wird, genügt es, daß ein verdächtiges Bakterium diesen Zucker zerlegt, um nicht als Typhusbacillus angesehen zu werden. Als Nährsubstrat benutzten wir in Eprouvetten lotrecht erstarrten Agar mit 2 Proz. Glukosegehalt. Unsere Epidemiebakterien wuchsen folgendermaßen: Wachstum längs des Stiches, während an der Oberfläche eine 4—5 mm im Durchmesser fassende Rosette sichtbar ist, die mit dem Stiche eine Art Nagel bildet und nie bis zu den Wänden des Röhrchens gelangt. Von dem Typhusbacillus aber unterscheiden sie sich dadurch, daß an der Länge des

Stiches sich Luftblasen entwickeln, die die Zersetzung der Glukose erzeugen. Zu bemerken ist aber, daß in den zahlreichen von uns unternommenen Kontrollversuchen die Zahl der Blasen nie größer war als 2—3, nur hirsekorn-, selten linsenkorngroß. Niemals sah man das bekannte Aussehen der Coli-Agarzuckerkultur: Große Luftblasen, meistens die Agarsäule in verschiedener Richtung gesprungen oder in mehrere Stücke zerrissen und von dem Boden des Röhrchens nach oben geschleudert.

Die noch so schwache Gasbildung reicht vollkommen aus, um die strittigen Bakterien als gaserzeugende zu erkennen und dementsprechend sie vollständig vom Typhusbacillus zu trennen. Trotzdem verdient es bemerkt zu werden, daß wir diese Erscheinung bei keiner unserer 58 Coli-Stämme zu beobachten Gelegenheit hatten. Diese schwache Gasbildung im glukosehaltenden Agar ist so charakteristisch, daß wir die Kulturen der Epidemiebakterien schon von der Entfernung aus von denen der 58 Coli-Stämme zu unterscheiden vermögen.

Die auf Laktosegärung sich gründende Differenzierung, ursprünglich mit Enthusiasmus und als entscheidend aufgenommen, mußte mit der Zeit einigen Beschränkungen unterworfen werden. Denn, wenn auch thatsächlich der Typhusbacillus unter keinen Umständen die Laktose in Gärung überführt, so berechtigt uns doch das Fehlen dieser Gärung nicht, ein Bakterium aus der Coli-Gruppe auszuscheiden. Was nun die Intensität anbetrifft, mit der die verschiedenen Coli-Typen die Moleküle dieses Zuckers angreifen, so kann sie innerhalb weiter Grenzen schwanken: Von wenigen feinen Gasblasen, die rasch verschwinden, bis zu einem großen Bläschenschaum, so daß fast der ganze freie Teil des Gärungskölbchens eingenommen wird; es können sämtliche Grade vorkommen. Von diesem Standpunkte aus ging man so weit, um anzunehmen, daß manche Coli-Typen eine derartige schwache Laktosegärung veranlassen, daß deren Erzeugnisse, nämlich das Vorhandensein der Gasblasen, nur durch künstliche Mittel zum Ausdruck gelangen. So behauptet Radziewski[1]), daß durch abgebrochene kurze Erschütterungen des Kulturröhrchens oder durch Einführung der etwas erwärmten Impfnadel es ihm gelungen sei, in der Kulturmasse Gasblasen sichtbar zu machen, die ohne diesen Kunstgriff nicht bemerkbar waren.

Wir müssen es eingestehen, daß wir uns nicht von dem Nutzen der künstlichen Hilfsmittel dieses Autors überzeugen konnten. Auf jeden Fall glauben wir nicht, daß diese Kunsthilfsmittel jemals einen praktischen Wert erlangen werden, da es unmöglich ist, den Wärmegrad anzugeben, den die Impfnadel nicht übersteigen darf, sowie die Intensität der Schüttelungen des Kulturröhrchens. Es wäre aber notwendig, daß beides angegeben werden könnte, damit Irrtümern vorgebeugt wird, denn, wenn wir die Röhrchen etwas stärker schütteln oder die etwas wärmere Platinnadel in die Kulturmasse einführten, gelang es uns, feine, schwindende Gasbläschen selbst in Typhuskulturen, ja sogar in sterilen Medien zu erzeugen.

Wohl aber müssen wir ohne jeden Vorbehalt jene Behauptung Radziewski's gutheißen, daß die Bouillon ein ungünstiges Medium zur Erkennung der Laktosegärung sei. Denn thatsächlich treten aus dem Fleisch in die Bouillon Substanzen über, die unter dem Einflusse

1) Radziewski, Beitrag zur Kenntnis des Bacterium coli. (Zeitschr. f. Hyg. Bd. XXXIV.)

bestimmter Mikrobien leichter in Gärung übergehen, so etwa Glukose, so daß wir irrtümlich annehmen könnten, daß die auf die Zersetzung dieser Substanzen zurückzuführende Gärung auf das Conto der Laktose zu schreiben sei, die aber thatsächlich gar nicht angegriffen ist. So erzeugen einige unserer Coli-Stämme Gasblasen in der mit Laktose versehenen Bouillon, aber nicht in jenen laktosehaltigen Nährmedien, die sicher keine Glukose enthalten.

Die von uns benutzte Nährsubstanz, um uns davon zu überzeugen, ob unsere Epidemiebakterien die Laktose angreifen, war, wie in den Untersuchungen Radziewski's, Koch's peptonisiertes Wasser, dem wir 2 Proz. Laktose und etwas Calcium carbonicum zusetzten. Es muß außerdem noch eine andere Maßregel ergriffen werden, betreffend das Gefäß, woselbst die Reaktion stattfinden soll. Zu derartigen Untersuchungen sollten die gewöhnlichen Eprouvetten ganz und gar nicht benutzt werden, da in diesen die Gasbildung nur bei jenen Bakterien beobachtet wird, die die Laktose äußerst stark angreifen, während, wie durch vergleichende Prüfungen mit einigen unserer Coli-Stämme festgestellt worden ist, schwache Gasbildungen unbemerkt stattfinden können. Es muß also die Reaktion nur in Gärungskölbchen vorgenommen werden. Eine andere Vorsichtsmaßregel, die übrigens in sämtlichen Handbüchern empfohlen ist, ist die, daß der freie Teil des Kölbchens gänzlich luftleer gemacht wird. Diese Maßregel ist besonders dann zu berücksichtigen, wenn es sich um Bakterien handelt, die nur schwach gaserzeugend sind. Schließlich sollen die Kulturen einige Stunden nach der Beschickung untersucht werden. So haben wir Exemplare von Coli, die wir ursprünglich für unfähig hielten, Laktose zu zersetzen, indem die 16—24 Stunden im Brütofen gelassenen Kulturen keine Luftblasen sichtbar werden ließen, während wir in Kulturen derselben Bakterien, die nur einige Stunden nach der Verimpfung untersucht wurden, eine dünne Schaumschicht mit äußerst kleinen Luftblasen, die nach wenigen Stunden schwanden, beobachten konnten.

Unter diesen Umständen haben wir die Wirkung unserer Epidemiebakterien auf die Laktose festgestellt. Unter diesen Verhältnissen erzeugte keine der 6 Bakterien irgend eine Gasblase, ebensowenig wie unsere 6 Typhusstämme, die zum Vergleiche gedient haben. Es ist vielleicht nicht unwichtig, zu erwähnen, daß von den 58 Coli-Stämmen 5 vorhanden waren, die, obwohl sie Glukose energisch genug in Gärung versetzten, doch die Laktose ebensowenig wie die Epidemiebakterien zersetzen konnten.

Capaldi und Proskauer[1]) haben im Jahre 1896 ein neues Differenzierungsmittel vorgeschlagen, um den Typhusbacillus vom Coli zu unterscheiden. Diese Methode beruht auf der Eigenschaft des Typhusbacillus, in dieser Hinsicht vom Coli verschieden, Mannit zu zersetzen und Milchsäure zu erzeugen in jenen Nährmitteln, in denen eine stickstoffhaltige Substanz vorhanden ist, die das Bakterium leicht zu assimilieren imstande ist, wie dies beim Pepton der Fall ist. Auf dieses Prinzip gegründet, haben diese Verff. eine flüssige Nährsubstanz vorgeschlagen, die aus Pepton und Mannit in destilliertem Wasser gebildet ist. Wie sie beobachten konnten, ändert der Typhusbacillus die durchaus neutrale Reaktion dieses Nährmittels in eine sauere, während Coli

1) Capaldi und Proskauer, Beiträge zur Kenntnis der Säurebildung beim Bacillus coli. (Zeitschr. f. Hyg. Bd. XXVII.)

die primitive neutrale Reaktion nicht angreift. Allein dieses Differenzierungsverfahren ist der Vergessenheit anheimgefallen, noch bevor es kontrolliert worden ist, so daß es nur in den neuesten Lehrbüchern nebenbei erwähnt wird, ohne Kommentar und ohne sonstige Würdigung. Soviel uns bekannt ist, ist dieses Verfahren bis auf Radziewski[1]) von keinem Forscher in systematischer Weise nachgeprüft worden. Soviel aus den Feststellungen dieses Autors ersichtlich ist, Feststellungen, die durch unsere Untersuchungen auf das vollkommenste bestätigt werden, verdient das Verfahren von Capaldi und Proskauer eine bedeutend größere Beachtung, als es bis jetzt geschehen ist, wenn es sich darum handelt, den Typhusbacillus vom Coli zu unterscheiden.

Radziewski untersuchte 71 Coli-Stämme, von denen nur 6 die neutrale Reaktion der Capaldi-Proskauer'schen Nährsubstanz in eine sauere umwandeln, und so dem Typhusbacillus ähnlich werden. Wir glauben, daß der Reaktion Capaldi-Proskauer's eine noch größere Bedeutung zuzuerkennen ist, unter der Bedingung aber, daß in der Zusammensetzung der Kulturflüssigkeit eine geringe Aenderung zugelassen wird. Diese besteht darin, daß wir zum Unterschiede von jenen, die insbesondere darauf dringen, daß das Nährmedium möglichst genau neutralisiert werde, ihm eine leicht alkalische Reaktion belassen. Die Gründe, die uns zu dieser Ansicht führten, daß die von uns vorgeschlagene alkalische Reaktion der von den Autoren vorgelegten neutralen vorzuziehen sei, besteht darin, daß die Zersetzung des Mannits unter dem Einflusse des Wachstums des Typhusbacillus eine genügend große Menge Milchsäure liefert, um das gesamte Alkali des alkalischen Nährmediums zu binden, daß aber trotzdem ein Ueberschuß freier Säure zurückbleibt. Daß dies der Fall ist, wird dadurch bewiesen, daß unsere sämtlichen 6 Typhusstämme das alkalische Capaldi-Proskauer'sche Nährmedium versäuern. Es ist also hieraus zu folgern, daß, sobald es sich um die Darstellung des Typhusbacillus handelt, es durchaus gleichgiltig ist, ob die Nährsubstanz neutral oder alkalisch ist.

Die Vorzüge des alkalischen Charakters der Capaldi-Proskauerschen Nährsubstanz treten erst dann in Erscheinung, wenn das verdächtige Bakterium zur Coli-Gruppe gehört. Thatsächlich sind Coli-Exemplare vorhanden, die das Mannit angreifen und eine geringe Säuremenge in der Kulturflüssigkeit erzeugen. Als Beispiel können die 6 Coli-Stämme Radziewski's dienen, die, wie erwähnt, das Capaldi-Proskauer'sche Nährmedium versäuerten, wenn auch in bedeutend geringerem Maße, wie es dieser Autor selbst bekennt, als der Typhusbacillus. So gering aber auch diese Versäuerung ist im Vergleiche zu jener des Typhus, so können doch Irrtümer betreffend ihrer Würdigung unterlaufen, von dem Augenblicke an, wo dieselbe überhaupt erkannt wird. Es ist nämlich nicht möglich, genau eine Grenze anzugeben, wo die Säurewirkung des Coli aufhört und die des Typhus anfängt. Hier, glauben wir, kann die Ueberlegenheit des von uns empfohlenen alkalischen Nährmediums eingreifen. Soviel wir uns überzeugen konnten, können Coli und deren Varietäten niemals im alkalischem Capaldi-Proskauerschen Medium eine sauere Reaktion erzeugen; höchsten könnten sie eine neutrale Reaktion veranlassen, während die Säuerung ein ausschließliches Zubehör des Typhusbacillus bleibt. Wir bekräftigen diese unsere Behauptung damit, daß von unseren 58 Coli-Stämmen 8, ebenso wie

1) Radziewski, l. c.

die 6 Radziewski's, in deutlicher, wenn auch schwacher Weise die neutrale Nährsubstanz Capaldi-Proskauer's versäuern, während in demselben Nährmedium, das aber vorläufig alkalisch war, die Reaktion alkalisch bleibt oder aber erst nach 7—8 Tagen neutral wird. Es ist recht wahrscheinlich, daß auch die 6 Coli Radziewski's die Nährsubstanz nicht versäuert hätten, wenn dieser, nach unserem Vorgange, dieselbe alkalisch gemacht hätte. In diesem Falle hätten wir, mit den Coli Radziewski's zusammen, 129 Coli-Stämme von verschiedenster Herkunft, die das Prinzip Capaldi-Proskauer's bestätigten. Wir glauben, daß diese Anzahl groß genug ist, wohlverstanden nach den bis jetzt unternommenen Versuchen, um diese Methode als eine der wertvollsten zu betrachten, ebenso wertvoll wie die Eigenschaft der Glukosegärung, wenn es sich um die Differenzierung des Typhusbacillus vom Coli handelt.

Wir sagten, daß wir der mannithaltigen Nährsubstanz eine leichte alkalische Reaktion verleihen. Was nun den Grad dieser Alkalinität betrifft, so ist nichts einfacher. Wir lassen der Nährsubstanz ihre natürliche Reaktion. Mit Pepton Witte und dem von uns benutzten Mannit, das wir von Merck bezogen, bekommt das Wasser eine alkalische Reaktion, entsprechend jener, die unsere Kulturmedien darbieten, wenn wir sie als leicht alkalisch bezeichnen. Unter solchen Umständen boten die von uns isolierten Epidemiebakterien die Reaktion der Mikrobien aus der Coli-Gruppe. Nach 24—48-stündigem Verweilen bei 37° bewahrt die beschickte Nährsubstanz dessen alkalische Reaktion. Nach 7—8 Tagen wird dieselbe neutral, ebenso wie bei den oben geschilderten 8 Coli-Stämmen, die wir in gewisser Beziehung, vom Standpunkte dieser Reaktion, als anormal bezeichnen können. Wir fanden aber keine Versäuerung der Nährsubstanz, selbst wenn die Kulturen noch so alt waren.

Ebenso gemeinsam ist unseren 6 Epidemiebakterien die Eigenschaft, Indol von der Eiweißmoleküle nicht zu trennen. Diesen Körper konnten wir durch keines der bekannten Mittel sichtbar machen, selbst wenn die Kulturen einige Wochen alt waren.

Es ist noch eine Eigenschaft vorhanden, die eine, fast möchten wir sagen absolute Identität dieser Bakterien feststellt; es ist dies die Art, wie sie die Milch beeinflussen. Sicherlich ist die Koagulierung der Milch eine jener hochwichtigen Charaktere, die, selbst wenn sie einzig in Erscheinung tritt, doch hinreicht, um uns im gegebenen Augenblicke dem Zweifel über den Typhusbacillus zu beheben. Allein der negative Ausfall der Probe kann diesen Wert nicht beanspruchen, indem das Fehlen der Milchgerinnung nicht die Coli-Natur eines Bakteriums auszuschließen vermag. In dieser Hinsicht finden wir Aufschlüsse in der citierten grundlegenden Arbeit Radziewski's. Unter den 71 von diesem Autor angeführten Coli sind 4 vorhanden, die die Milch nicht zum Gerinnen bringen. Es ist richtig, daß derselbe die betreffenden Kulturen nicht länger als 72 Stunden beobachtete. Unserer Meinung nach reicht dieser Zeitraum nicht für alle Fälle; denn wenn auch die meisten Coli schon nach 24—48 Stunden die Milch vollkommen gerinnen, so sind doch andere vorhanden, die das Caseïn nur sehr langsam präcipitieren. So ist in unserer Sammlung ein Bacillus vorhanden, der als Coli No. 43Vc bezeichnet ist und der die Milch 8 Tage flüssig läßt; erst etwa vom 9. Tage an beginnen sich große Flocken zu bilden und bis zum 12. Tage wird die Milch vollkommen geronnen. Vielleicht hätten auch die 4 Coli

Radziewski's zu allerletzt doch noch die Milch koaguliert, wenn sie einer längeren Beobachtung unterworfen worden wäre. Trotzdem wollen wir das nicht mit absoluter Sicherheit behaupten, da wir auch andere Thatsachen zu beobachten Gelegenheit hatten, die uns dazu verpflichten, das Vorhandensein nicht gerinnungserzeugender Coli zuzugeben. So koaguliert Coli No. 58 Hm unserer Sammlung die Milch selbst dann nicht, wenn sie 3 Monate bei 37° aufbewahrt wird.

Wir wollen uns für den Augenblick darauf beschränken, die Art festzustellen, wie sich unsere Epidemiebakterien in der Milch verhalten. Die Kulturen sind $2^{1}/_{2}$ Monate beobachtet worden, während welcher Zeit sie bei 37° und bei Zimmertemperatur aufbewahrt wurden. Kein einziges dieser Bakterien bot jene Veränderungen, die Coli in solchen Umständen gewöhnlich bieten. Es soll dies nicht bedeuten, daß die Milch unverändert geblieben ist; umgekehrt war deren Aussehen verschieden von derjenigen, in welcher der Typhusbacillus gedeiht.

Unter allen in der Litteratur vorgefundenen Angaben kann dieses eigentümliche Aussehen nur mit jenen verglichen werden, das Coli C_{12}, der von Sternberg[1]) studiert wurde, geboten hat. So verdickt sich die Milch, in welcher sich unsere Epidemiebakterien entwickeln, erst nach mehreren Tagen und wird dieselbe dann syrupartig oder sahneartig. Diese sahneartige Masse ist aber durchaus einförmig, läßt beim Schütteln keine Flocken an den Gefäßwänden haften und beim langen Stehen keinen Tropfen Serum sich absondern. Es ist ein auffallender Unterschied zwischen der von diesen Bakterien modifizierten Milch und jener vorhanden, die dem Coli als Nährsubstanz gedient hat. Nur in den Kulturen des Bakteriums No. 6, Ap. bemerken wir an der Oberfläche dieser derartig modifizierten Milch eine messerdicke Schicht Serum. In den Kulturen der 6 Epidemiebakterien wird die Reaktion der modifizierten Milch alkalisch.

Wir werden jetzt eine andere Reihe von Eigenschaften besprechen, die wir als in zweiter Ordnung für die Identifizierung der betreffenden Bakterien stehend ansehen. Wir beginnen mit derjenigen, die auf das Wachstum auf Gelatine Bezug hat. Um es nicht zu wiederholen, bemerken wir vorweg, daß keines dieser Bakterien diese Substanz verflüssigt. Alle gedeihen recht gut und es bieten ihre Kolonieen auf Gelatineplatten eine Reihe gemeinsamer Eigenschaften, aber auch eine differentielle, die vielleicht als sekundär anzusehen ist, die wir aber trotzdem der Präcision wegen erwähnen wollen. In der Tiefe bieten die Kolonieen nichts Charakteristisches. An der Oberfläche sind sie blattähnlich, mit lappigen Rändern, ursprünglich farblos, durchsichtig, schwach bläulich, wenn man sie beim durchfallenden Lichte besichtigt, und derart, daß die Strahlen schräg durch die Schale das Auge treffen, 48 Stunden nach deren Erscheinen aber werden sie undurchsichtig und erscheinen unter dem Mikroskope gelb. Ihre Oberfläche ist unregelmäßig, wellig, mit Erhabenheiten, die durch lineare strahlige Vertiefungen voneinander getrennt sind; aus diesen strahligen Linien verzweigen sich seitliche kurze, die mit den Hauptlinien spitze Winkel bilden. Dieses Liniensystem, das der Nervatur des Blattes entspricht, mit der wir die Kolonieen verglichen, ist im großen und ganzen weniger ausgesprochen, diffuser und unregelmäßiger als bei den Kolonieen des Typhusbacillus. Erwähnenswert ist, daß diese Kolonieen auf der Gelatineplatte niemals,

1) Sternberg, l. c.

bevor 48 Stunden verstrichen sind, erscheinen. Sie sind zu Beginn punktförmig, wachsen langsam und werden nie größer als 4 mm im Durchmesser. Dies trifft zu für das Bakterium No. 1, N. J. und No. 2, N. J., die Bakterien No. 3, N. R., No. 4, G. R. und No. 5, V. R. bieten den Unterschied, daß deren Kolonieen, obwohl sie ebenfalls langsam, trotzdem aber nach mehreren Tagen doch größer werden, 6—8 mm im Durchschnitte, ohne aber die gewöhnliche Größe des Coli zu erlangen. Die Kolonieen des Bakteriums No. 6, Ap. wachsen rascher, werden sichtbar nach 24 Stunden, bleiben aber kleiner als die der Bakterien No. 3, 4 und 5, indem sie von diesem Standpunkte aus sich eher den Bakterien No. 1 und 2 nähern. (Schluß folgt.)

Syphilis und Malaria.

Eine parasitologische Hypothese.

Von Dr. **Reinhold Ruge,** Marine-Oberstabsarzt und Privatdocent.

Die Generalidee der untenstehenden Ausführungen ist folgende: Ich will an der Hand der bekannten Thatsachen der speziellen Malaria- und Syphilis-Pathologie und -Therapie einen Vergleich zwischen den beiden genannten Krankheiten entwickeln, und versuchen, zu zeigen, daß man aus den Thatsachen, die man bei einer gut studierten Infektionskrankheit gefunden hat, Rückschlüsse auf das Wesen einer anderen, scheinbar gänzlich verschiedenen Infektionskrankheit machen kann.

Wenn wir Syphilis und Malaria im allgemeinen miteinander vergleichen, so finden wir manches Aehnliche und manches Verschiedene:

1) Zunächst haben wir bei beiden Krankheiten eine ausgesprochene und deutlich begrenzte Inkubationszeit, die bei der Malaria etwa 2, bei der Syphilis durchschnittlich 3 Wochen beträgt. Ich setze für die Inkubationsdauer der Syphilis deshalb 3 Wochen an, weil ich das Ulcus durum nicht als Lokalerkrankung ansehe, sondern als den Ausdruck der bereits erfolgten Allgemeininfektion. Denn es ist bis jetzt noch nie gelungen, den Ausbruch der sogenannten Allgemeinerscheinungen der Syphilis dadurch zu verhindern, daß man das Ulcus durum chirurgisch entfernte oder spezifisch behandelte.

2) Bei beiden Erkrankungen haben wir die merkwürdige Erscheinung, daß sie beide mit Sicherheit nur in einem gewissen Stadium übertragbar sind, und zwar beide in ihrem Frühstadium. Bei der Syphilis ist es ja schon lange bekannt, daß Uebertragungen im sogenannten Spätstadium ganz außerordentlich selten sind und wahrscheinlich durch Reste vermittelt werden, die vom Frühstadium übrig geblieben sind. Bei der Malaria ist dieser Vorgang in ähnlicher, wenn auch nicht so scharf ausgesprochener, Weise vorhanden.

3) Beide Krankheiten hinterlassen eine ausgesprochene, lange anhaltende Immunität.

4) Beide Krankheiten haben eine ausgesprochene Neigung zu Rückfällen. Diese Rückfälle, die stets eintreten, wenn nicht eine entsprechende Therapie eingreift, sind manchmal bei der Malaria durch bestimmte Gelegenheitsursachen, die den ganzen Körper in Mitleidenschaft ziehen, wie Durchnässung, Erkältung, intensive Sonnenbestrahlung, Ueber-

anstrengung, Verwundungen und interkurrente Krankheiten hervorgerufen, oder sie können auch, wie das meist bei der Syphilis der Fall ist, scheinbar ohne nachweisbare Ursache auftreten.

5) Es ist bemerkenswert, daß sowohl bei Syphilis als auch bei Malaria die Krankheitserreger sich nicht nur in denjenigen Organen finden, in denen sich die pathogenen Mikroorganismen überhaupt mit Vorliebe anzuhäufen pflegen (Milz und Knochenmark), sondern namentlich auch im Gehirn. Bei der Syphilis treten die Gehirnerkrankungen allerdings erst im Spätstadium auf, während wir bei der tropischen Malaria die Verstopfung der Gehirnkapillaren mit Malariaparasiten regelmäßig im Frühstadium finden.

Nun ist es ja fraglos, daß die Gehirnerkrankungen im Spätstadium der Syphilis etwas ganz anderes sind als die Krankheitserzeugnisse des Frühstadiums der Syphilis, und daß wir eine derartige auffallende Scheidung der Krankheitsphasen, wie wir sie bei der Syphilis finden, im Verlaufe der Malaria nicht haben. Wenn ich trotzdem die Affinität der Erreger der beiden in Rede stehenden Krankheiten zu demselben Organ (Gehirn) mit zum Vergleich heranziehe, und daraus mit auf eine ähnliche Beschaffenheit der betreffenden Erreger schließen will, so bedarf das einer Begründung. Ich werde sie später geben. Zunächst will ich nur hervorheben, daß trotz der zahlreichen Forschungen, die nach den Syphiliserregern angestellt worden sind, diejenigen Organismen, die als Syphiliserreger angesprochen worden sind, sich bis jetzt allgemeine Anerkennung nicht haben erringen können.

Indes ich glaube, daß man aus folgenden Thatsachen Schlüsse auf das Wesen der Syphiliserreger ziehen kann. Zu den oben angeführten Vergleichspunkten, die ja doch die Idee nahe legen, daß Syphiliserreger und Malariaparasiten von ähnlicher Beschaffenheit sein könnten, kommen noch weitere Umstände hinzu, die den oben ausgesprochenen Gedanken an Wahrscheinlichkeit gewinnen lassen.

Wir stehen ja der Syphilis und der Malaria ganz anders gegenüber als den meisten anderen Infektionskrankheiten — Diphtherie, Gelenkrheumatismus und Lyssa nehme ich bis zu einem gewissen Grade aus — denn wir besitzen zur Bekämpfung der beiden in Rede stehenden Krankheiten sicher wirkende Specifica. Wir sind nicht lediglich darauf angewiesen, diese beiden Krankheiten durch allgemeine hygienische Maßnahmen einzudämmen, sondern wir können die ausgebrochene, in voller Entwickelung befindliche Krankheit unterbrechen und heilen. Dabei haben wir den großen Vorteil, daß wir den Erreger der einen Krankheit, der Malaria, nicht nur kennen, sondern daß wir ihn in Bezug auf Entwickelung und Lebenseigentümlichkeiten so genau kennen, wie kaum einen anderen pathogenen Mikroorganismus. Ja, wir können sogar unter dem Mikroskop verfolgen, in welcher Weise die von den Malariaparasiten hervorgerufenen krankhaften Störungen von den verschiedenen Entwickelungsstufen dieser Parasiten abhängig sind.

Nehmen wir als Beispiel den leicht zu beobachtenden Tertianparasiten. Aus den Untersuchungen Golgi's wissen wir, daß immer im unmittelbaren Anschluß an die Teilung der Parasiten der Fieberanfall auftritt. Da sich während der Apyrexie nie Teilungsformen finden, sondern immer nur kurz vor und im Fieberbeginn, so sind wir zu dem Schlusse berechtigt: Die Teilung der Parasiten ruft das Fieber hervor. Soll also das Fieber unterdrückt werden, so muß die Teilung der Parasiten verhindert werden. Nun haben wir im Chinin ein Specificum. Wie muß

das angewendet werden? Wirkt es immer oder — und das ist hier die wichtige Frage — nur unter bestimmten Voraussetzungen? Die Erfahrung hat gelehrt, daß man das Chinin bei unseren heimischen intermittierenden Fiebern (Tertiana und Quartana) 5—6 Stunden vor dem zu erwartenden Anfall geben muß, wenn man diesen unterdrücken will. Da nun aber, wie wir jetzt wissen, das Chinin in der That nichts weiter thut, als daß es die Malariaparasiten an der Teilung verhindert, und daß die Höhe der Chininwirkung etwa 4 Stunden nach der Einverleibung eintritt, und andererseits die Teilung der Parasiten schon 1—2 Stunden vor dem Anfall beginnt, so geben uns diese Thatsachen die wissenschaftliche Erklärung dafür, weshalb der erwartete Anfall ausbleibt, wenn das Chinin 5—6 Stunden vor dem Anfall gegeben wird, bei einer anderen Art der Chinindarreichung aber doch eintritt. Zugleich zeigt diese Thatsache, daß der Malariaparasit nur in einer bestimmten Entwickelungsstufe vom Chinin beeinflußt wird.

Wie steht es nun mit der Quecksilberwirkung bei der Syphilis? Ich habe schon oben erwähnt, daß alle die Versuche, durch die spezifische Behandlung eines unzweifelhaften Ulcus durum den Ausbruch der sogenannten Allgemeinerscheinungen der Syphilis zu verhindern, nicht gelungen sind. Diese Erscheinungen treten doch auf und sind dann hartnäckiger und schwerer zu beseitigen, als wenn mit der Einleitung der spezifischen Kur bis zum Auftreten der Allgemeinerscheinungen gewartet wird. Diese therapeutische Erfahrung entspricht also dem, was wir eben bei der Malaria gefunden haben, d. h. auch der Syphiliserreger ist für sein Specificum nur in einem bestimmten Entwickelungsstadium zugängig.

Diese Aehnlichkeit beider Krankheiten in therapeutischer Beziehung im Verein mit den in klinischer und pathologischer Beziehung gefundenen Aehnlichkeiten legen wiederum die Annahme nahe, daß wir es beim Syphiliserreger wahrscheinlich mit einem Lebewesen zu thun haben, das gleich dem Malariaparasiten zu den Protozoen gehört[1]).

Nun wird man aber einwenden können, daß diese Schlußfolgerung zu weitgehend wäre. Es beständen zwar manche Aehnlichkeiten zwischen den beiden Krankheiten, es wären doch aber auch deutlich in die Augen fallende Unterschiede vorhanden, die der Erklärung bedürften. Zunächst wäre es auffällig, daß die bekannten Erreger der einen Krankheit im Spätstadium (Malariakachexie) dieser Krankheit meistens verschwänden und daß dieses Spätstadium lediglich eine Fortsetzung der Krankheitserscheinungen des Frühstadiums darböte, während wir im Spätstadium der anderen Krankheit, der Syphilis, Krankheitserscheinungen ganz verschiedener Art von denen des Früh- oder Sekundärstadiums zu sehen bekämen und diese letztere Krankheit in diesem Stadium ebenfalls nicht mehr von Mensch zu Mensch übertragbar wäre. Demnach dürfte also kaum angenommen werden, daß die Krankheitserscheinungen der Spätsyphilis von Parasiten hervorgerufen würden, die denen der Malaria ähnlich wären.

Dieser Einwurf ist durchaus gerechtfertigt. Ich hoffe ihn aber durch die nachfolgenden Ausführungen zurückweisen zu können.

Zu diesem Zwecke muß ich wieder von der Malaria ausgehen, deren Erreger ja bekannt sind. Nun zeichnen sich viele Protozoen dadurch aus, daß sie Schmarotzer sind und daß bei ihnen der Generationswechsel

1) Döhle ist auf Grund seiner Untersuchungen zu der Ueberzeugung gelangt, daß der Syphiliserreger zu den Protozoen gehört.

weit verbreitet ist. Der Generationswechsel hat aber zur Vorbedingung, daß die Parasiten, bei denen er vorkommt, sowohl ungeschlechtliche als auch geschlechtliche Formen bilden. Das ist nun bei den Malariaparasiten der Fall. Wir finden aber die geschlechtlichen und die ungeschlechtlichen Formen nicht bei allen Malariaparasitenarten zu gleicher Zeit im Körper desselben Wirtes. Gleichzeitig in demselben Wirtskörper finden wir sie z. B. bei den menschlichen Malariaparasiten und bei der einen Art der Vogelmalaria, dem Proteosoma. Bei dem anderen echten Vogelmalariaparasiten, dem Halteridium, das namentlich im Taubenblut vorkommt, aber nicht. Da finden und kennen wir bis jetzt nur die geschlechtlichen Formen (Gameten). Das Gleiche ist der Fall bei dem von R. Koch entdeckten und von Kossel beschriebenen Affenparasiten.

Zweitens wissen wir, daß lediglich die ungeschlechtlichen Formen der Malariaparasiten, die Schizonten, in den warmblütigen Zwischenwirtstieren vermehrungsfähig und von Individuum zu Individuum derselben Wirtstierspecies übertragbar sind, nicht aber die geschlechtlichen Formen, die Gameten. Drittens beobachten wir, daß die ungeschlechtlichen Formen meistens erst gebildet werden, wenn die Sporozoeninfektion eine Zeit lang bestanden hat. Schließlich aber, wenn die Sporozoeninfektion längere Zeit bestanden hat und ein gewisser Grad von Immunität erreicht ist, können die ungeschlechtlichen Formen verschwinden und nur die geschlechtlichen übrig bleiben. Wir finden diesen Vorgang sehr gut bei der tropischen Malaria ausgeprägt. Da treffen wir bei den Neuerkrankungen in der ersten Zeit nach der Infektion nur die ungeschlechtlichen Formen des Tropenfieberparasiten in Gestalt der verschieden großen Tropenringe an. Erst später, wenn eine geeignete Behandlung nicht Platz gegriffen hat und das Fieber sich selbst überlassen blieb, erscheinen neben den ungeschlechtlichen Formen die geschlechtlichen Formen des Tropenfieberparasiten, die Halbmonde. Bei den alten Fiebern kann es aber vorkommen, daß man nur noch die geschlechtlichen Formen, die Halbmonde, findet, während die ungeschlechtlichen Formen, die Ringe, verschwunden sind.

Diese Thatsachen und der Umstand, daß nur die ungeschlechtlichen Formen der Malariaparasiten von Individuum auf Individuum derselben Species übertragen werden können, geben uns den Schlüssel zur Erklärung des eigentümlichen Verhaltens der Syphilis im Spätstadium. Nach dem jetzigen Stande unserer Kenntnisse über die Protozoen, die allerdings noch recht lückenhaft sind, müssen wir annehmen, daß der als Protozoe angesprochene Erreger der Syphilis ungeschlechtliche und geschlechtliche Formen bildet, daß im Frühstadium der Syphilis — die galoppierende Syphilis ausgenommen — sich ausschließlich oder fast ausschließlich die ungeschlechtlichen Formen im menschlichen Körper finden, die Syphilis in diesem Stadium also von Individuum zu Individuum der Species „homo" übertragbar ist und daß die von Individuum zu Individuum derselben Species nicht mehr übertragbaren geschlechtlichen Formen in Menge erst im Spätstadium der Syphilis gebildet werden. Ein Unterschied ist allerdings vorhanden. Die Entwickelung der geschlechtlichen Formen der Malariaparasiten ist dem Erkrankten nicht gefährlich, wohl aber die Entwickelung der geschlechtlichen Formen der Syphilis. Das zeigen die von den Gummata angerichteten Zerstörungen. Dazu kommt, daß sich die entsprechenden Entwickelungsvorgänge, die bei der Syphilis Jahre in Anspruch nahmen, bei der Malaria in Wochen und Monaten vor sich gehen.

Noch möchte ich auf einen Punkt aufmerksam machen, der geeignet ist, die eben aufgestellte Vermutung über die Beschaffenheit der Syphiliserreger zu unterstützen. Diese Stütze bietet wiederum die Therapie. Gegen beide Krankheiten besitzen wir, wie bereits wiederholt hervorgehoben, eine spezifische Therapie. Aber unsere Specifica sind nicht imstande, alle Entwickelungsstadien der betreffenden Krankheitserreger in gleicher Weise zu beeinflussen. Wie oben ausgeführt, sind selbst die ungeschlechtlichen Formen der Malariaparasiten nur in einem ganz bestimmten Entwickelungsstadium der Chininwirkung zugängig. Gegenüber den geschlechtlichen Formen, den Gameten, versagt aber das Chinin. Ich erinnere nur an die bekannte Widerstandsfähigkeit der Gameten des Tropenfieberparasiten, der Halbmonde, gegen das Chinin. Diese Gameten kann aber der Körper mit seinen natürlichen Hilfskräften schließlich vernichten, so daß ihre Entstehung für das erkrankte Individuum belanglos ist und sie nur für die weitere Uebertragung durch den eigentlichen Wirt, die Gabelmücke (Anopheles), in Betracht kommen. Anders steht es mit den hypothetischen Gameten der Syphiliserreger. Gegen diese reichen die natürlichen Schutzkräfte des Organismus nicht aus. Da muß die Therapie eingreifen, und zum Glück ist uns im Jod ein wirksames Specificum gegeben.

Wir sehen also, daß auch bei der Syphilis dasjenige Mittel, das gegen die ungeschlechtlichen, von Individuum zu Individuum derselben Species übertragbaren Formen spezifisch wirkt, gegen die geschlechtlichen Formen der Syphiliserreger nicht wirkt. Nun giebt man ja in praxi trotz und alledem auch im Spätstadium der Syphilis Quecksilber und Jod zusammen mit gutem Erfolg, und es könnte daher scheinen, als ob die oben aufgestellte Hypothese durch diese Thatsache unwahrscheinlich gemacht würde. Indes die Entwickelung der ungeschlechtlichen und geschlechtlichen Formen der Syphiliserreger wird ebenso wie diejenige der Malariaparasiten zeitlich nicht durchgehend scharf voneinander getrennt vor sich gehen, sondern wir werden auch im Spätstadium der Syphilis immer noch ungeschlechtliche Formen neben den in überwiegender Mehrzahl vorhandenen geschlechtlichen Formen finden und diese Annahme würde die gute Wirkung der kombinierten Quecksilber-Jod-Behandlung erklären.

Aber auch die weiteren therapeutischen Thatsachen bieten eine fernere Stütze für unsere Hypothese. Wir wissen, daß wir bei der Malaria durch eine von vornherein richtig eingeleitete und genügend lange fortgesetzte, intermittierende Chininbehandlung nicht nur die Entwickelung der ungeschlechtlichen Formen und damit das Auftreten von Rückfällen verhindern, sondern auch die Bildung der geschlechtlichen Formen beschränken können. Da wir nun durch eine entsprechende Behandlung der Syphilis (Fournier's intermittierende Behandlung) so gute Erfolge erzielen und diese Erfolge besonders dann gut sind, wenn vom ersten Jahre nach der Infektion ab die kombinierte Jod-Quecksilber-Behandlung stattfindet, so vernichten wir durch eine solche Behandlung wahrscheinlich nicht nur die ungeschlechtlichen Formen der Syphiliserreger, sondern verhindern auch die Bildung der gefährlichen geschlechtlichen Formen oder verhindern, wenn solche bereits vorhanden sind, deren Weiterentwickelung.

Allerdings muß eine entsprechende Behandlung bei der Syphilis sehr viel länger dauern als bei der Malaria, weil, wie bereits gesagt,

die entsprechenden Entwickelungsvorgänge im ersten Falle Jahre, im zweiten nur Wochen oder Monate in Anspruch nehmen.

So weit schiene nun alles zur Stütze der Annahme geeignet, daß wir es bei dem Syphiliserreger mit einem Protozoen zu thun haben. Es ist aber der Unterschied in der Uebertragungsweise der beiden in Rede stehenden Krankheiten so ungeheuer, daß es auf den ersten Blick kaum möglich erscheint, als ob sich bei einem solchen Uebertragungsunterschied die Annahme einer nahen Verwandtschaft der beiden Krankheitserreger noch aufrecht erhalten ließe. Ich gebe das zu und verweise nur darauf, daß wir unter den Protozoen auch direkte Uebertragungen kennen, so z. B. beim Coccidium oviforme, und daß also dieser verschiedene Uebertragungsmodus kein Grund ist, die Annahme, daß der Syphiliserreger wahrscheinlich zu den Protozoen gehört, abzulehnen.

Neue Beobachtungen über die Larven von Anopheles und Culex im Winter.

[Aus dem hygienisch-parasitologischen Institute der Universität Lausanne.]

Von Prof. Dr. **Bruno Galli-Valerio** und Mme Dr. **G. Rochaz.**

Im Centralbl. f. Bakt. etc Bd. XXIX [1]) hat einer von uns mit Herrn cand. med. Narbel diejenigen Beobachtungen dargelegt, welche während des Winters 1900—1901 über das Ueberwintern der Larven von *Anopheles* und *Culex* gemacht wurden. Seit der Veröffentlichung dieser Arbeit wurde kein neuer Beitrag zu der Frage geliefert. Sogar Nuttall und Shipley in ihrer interessanten Arbeit über die Biologie der *Anopheles* [2]) begnügen sich, anzugeben, Larven von *A. bifurcatus* im Laboratorium den Winter über aufbewahrt zu haben und Grassi in der 2. Auflage seiner Studien über Malaria [3]) sagt nur, daß man Larven von *A. bifurcatus* in Italien während des Winters finden kann. Es ist außerdem sonderbar, daß Giles [4]) in der 2. Auflage seines vortrefflichen Werkes, obgleich er Nuttall und Shipley's Arbeit zu Rate gezogen hat, in der sich, kurz zusammengefaßt, die Arbeit befindet, welche einer von uns mit Herrn Narbel veröffentlichte, Folgendes schreibt: „In northern Europe all larvae and pupae that may not be ripe for their remaining metamorphoses, perish during the winter, but in Italy, according to Celli, the larvae of *Anopheles* hybernate.“

Wir haben während des Winters 1901—1902 unsere Beobachtungen über das Ueberwintern der Culiciden in Larvenform fortgesetzt. Neben etlichen hier und dort im Kanton Waadt gemachten Forschungen fanden wir wichtig, eine gegebene Pfütze vom Monat Oktober bis zum Monat Mai zu beobachten, um die möglichen successiven Modifikationen feststellen zu können, welche die Larven der Culiciden während dieser Zeit erleiden könnten. Wir wählten eine Pfütze in der Ebene von Orbe

1) Centralbl. f. Bakt. etc. Abt. I. Bd. XXIX. 1901. p. 898.
2) Journ. of Hyg. 1901. p. 451.
3) Studi di uno zoologo sulla malaria. Roma 1901. 2. ed.
4) Handbook of the gnats or mosquitoes. London 1902. 2. ed.

Pfütze in Beobachtung vom 27. Oktober 1901 bis zum 26. Mai 1902.

Datum	Temper. des Wassers	Temper. der Luft	Ergebnisse der Untersuchungen	Beobachtungen
27. Okt. 1901	+ 9°	—	Zahlreiche mittelgroße und kleine Larven von *Anopheles*	
3. Nov.	+ 8° (4 Uhr	+ 7° nachm.)	Zahlreiche sehr kleine und mittelgroße Larven von *Anopheles*	
9. Nov.	+ 4½° (4 Uhr	+ 7° nachm.)	Zahlreiche Larven von *Anopheles*	Einige dieser Larven werden am 12. Nov. in eine Maceration von trockenem Hanf gesetzt. Es bilden sich am 9. Dez. 2 Nymphen (Zimmertemperatur +8°) und diese Nymphen geben am 17. Dez. 2 ♂ von *A. bifurcatus*. Es bildet sich eine 3. Nymphe (Zimmertemperatur + 11°). 2 Nymphen am 21. Dez., 1 am 24. Dez. Am 28. Dez. entwickelt sich eine ♀ von *A. bifurcatus*. Am 30. Dez. formt sich eine 7. Nymphe und am 31. entwickeln sich 2 ♂ v. *A. bifurcatus*
15. Nov.	+ 7° (3 Uhr	+ 7° nachm.)	Zahlreiche Larven von *Anopheles*	In einer Pfütze der Umgebung findet man 20 Nymphen von *Culex* (*C. annulatus*), große Larven von *Culex* und Larven von *Anopheles*
22. Nov.	+ 6° (10 Uhr	+ 6° vorm.)	Zahlreiche Larven von *Anopheles*	In einer Pfütze der Umgebung findet man einige Larven von *Anopheles*, in einer anderen 2 Nymphen von *Culex*, welche am 27. Dez. *C. annulatus* entwickeln
29. Nov.	+ 4½° (10 Uhr vorm.) Eisschicht von ½—4 ccm Dicke	+ 3°	Larven von *Anopheles* ziemlich häufig; einige von *Culex*. Die Larven scheinen sehr wenig lebhaft zu sein und haben sich in den Carex geflüchtet, wo sich das Eis zuletzt gebildet hat	Die anderen Pfützen der Umgebung sind mit einer Eisschicht von 3—4 cm bedeckt
7. Dez.	+ 1½° (10 Uhr vorm.) Eisschicht von 3—6 cm	+ 1½°	Keine Larven von *Anopheles* unter dem dicken Eis, obgleich man 10—12 Löcher in das Eis schlägt. 4 Larven von *Anopheles* werden in dem Carex gefunden	
19. Dez.	+ 2° (4 Uhr nachm.) Eisschicht von 1—5 cm	+ 3°	Mehrere Larven von *Anopheles* und *Culex*	
28. Dez.	+ 1½° (10 Uhr vorm.) Eisschicht von 1—2 cm	+ 1°	Man findet in dem Carex 5 Larven von *Anopheles* und 1 von *Culex*	In einer Pfütze der Umgebung sind zahlreiche und große Larven von *Culex*

Datum	Temper. des Wassers	Temper. der Luft	Ergebnisse der Untersuchungen	Beobachtungen
3. Jan. 1902	+ 7° (3 Uhr nachm.) kein Eis mehr, aber viel Wasser, von geschmolz. Schnee herrühr.	+ 7°	Man fängt in den Carex 13 Larven von *Anopheles* auf einmal. Im freien Wasser ist nicht eine einzige Larve zu finden	
15. Jan.	+ 1½° (3 Uhr nachm.) Eisschicht von ½—3 cm	— 1½°	Man findet Larven von *Anopheles* und eine Larve von *Culex* in den Carex	In den anderen Pfützen findet man unter einer dicken Eisschicht zahlreiche, sehr kleine Larven von *Culex*. Am häufigsten sind sie in einer Pfütze, welche vom 1. Dez. bis 1. Jan. trocken geblieben war und sich dann mit Schneewasser angefüllt hatte, nachdem die warme Temperatur der ersten Tage des Januar den Schnee geschmolzen hatte.
24. Jan.	+ 2° (3 Uhr nachm.) Eisschicht von 1—3 cm	+ 9°	Zahlreiche Larven von *Anopheles* und einige von *Culex*	
26. Jan.	+ 3° (10 Uhr vorm.) kein Eis mehr	—	Zahlreiche Larven von *Anopheles*	
8. Febr.	+ 4½° (10 Uhr vorm.) fast kein Eis, aber sehr viel Wasser	+ 9°	Zahlreiche große Larven von *Anopheles* in den Carex	
23. Febr.	—	—	—	In einem Weiher bei Agiez (528) bei Orbe unter einer dünnen Eisschicht findet man mehrere kleine und mittelgroße Larven von *Anopheles*, welche sich meistens in den Schilf- und Carex-Pflanzen befinden. Wassertemperatur + 4°.
24. Febr.	+ 7° (2 Uhr nachm.) dünnes Eis; viel Wasser	+ 4°	Zahlreiche Larven von *Anopheles* und *Culex*	In den Pfützen der Umgebung einige mittelgroße und einige sehr große Larven von *Culex*. Vermischt mit diesen eine Generation kleiner, kaum sichtbarer Larven von *Culex*. Auch einige Larven von *Anopheles*
6. März	+ 11° (2 Uhr nachm.)	+ 8°	Zahlreiche große Larven von *Anopheles* in den Carex	In den Pfützen der Umgebung zahlreiche Larven von *Culex* von allen Größen und viele Larven von *Anopheles*, kleine und mittelgroße
9. März	+ 10° (4 Uhr nachm.)	—	Viele Larven von *Anopheles*	
13. März	—	—	—	In den Sümpfen bei Bavois (445 m) in der Ebene von Orbe eine Menge Larven von *Anopheles* und *Culex*. In den Sümpfen von Villars (442 m) findet man nur sehr große und sehr kleine Larven von *Culex*

Datum	Temper. des Wassers	Temper. der Luft	Ergebnisse der Untersuchungen	Beobachtungen
16. März	+ 5° (10 Uhr	+ 5° vorm.)	Viele Larven von *Anopheles* und *Culex*	In einigen Pfützen bei Pré Motthey, in der Ebene von Orbe zahlreiche Larven von *Culex*, aber keine von *Anopheles*. In einem Sumpfe von l'Abergement (642 m) mit einer Lufttemperatur von + 9° und einer Wassertemperatur von + 10° viele große und sehr kleine Larven von *Culex*
20. März	+11½° (3 Uhr	+14½° nachm.)	Eine Menge großer, mittelgroßer und kleiner Larven von *Anopheles*	Es bildet sich die erste Nymphe bei den am 9. März eingesammelten Larven. In einem Hause bei Orbe fängt man 5 erwachsene *C. annulatus*, welche im Zimmer herumflattern
22. März	—	+ 5°	—	Es bilden sich 2 Nymphen bei den Larven von *Anopheles*, welche am 13. März bei Bavois gesammelt wurden
25. März	—	+ 2½°	—	Es bilden sich 5 Nymphen bei den Larven von *Anopheles*, am 13. März bei Bavois eingesammelt, und eine Nymphe von *Culex*, bei Larven von *Culex* den gleichen Tag eingesammelt
26. März	+ 9° (3 Uhr	+ 6° nachm.)	Viele Larven von *Anopheles* und einige von *Culex* in den Carex	In den Pfützen der Umgebung einige Larven von *Anopheles*, wovon sehr kleine; zahlreiche große Larven von *Culex*; eine Generation sehr kleiner Larven von *Culex*
2. April	+ 7°	+ 10°	Mehrere Nymphen, viele Larven von *Anopheles*	Bei den Larven von *Anopheles* vom 9. März entwickelt sich ein ♂ von *A. bifurcatus*. Zahlreiche Nymphen in allen Gefäßen, in welchen man die während des Winters eingesammelten Larven aufbewahrte
4. April	—	—	—	In den Sümpfen von Bavois (445 m) Larven von *Anopheles* und zahlreiche Nymphen. In den Sümpfen von Villars (442 m) keine Larven von *Anopheles*, aber sehr große und zahlreiche Larven von *Culex*
5. April	+ 12° (3 Uhr	+ 10° nachm.)	Zahlreiche Larven und Nymphen von *Anopheles* in den Carex	In den Pfützen der Umgebung viele Larven von *Anopheles* und *Culex*. Eine Larve von *Anopheles*, welche 1½ mm mißt, scheint eben ausgeschlüpft zu sein
6. April	—	+ 10°	—	Bei den am 20. März eingesammelten Larven entwickeln sich 2 ♀ *A. bifurcatus* und bei denjenigen vom 13. März 5 ♂ und 1 ♀ von *A. bifurcatus*

Datum	Temper. des Wassers	Temper. der Luft	Ergebnisse der Untersuchungen	Beobachtungen
7. April	—	—	—	Die Larven vom 20. März geben 1 ♂ und 1 ♀ von *A. bifurcatus*
8. April	—	—	—	In einem Sumpfe zwischen Montcherand und Valeyres (570 m) findet man zahlreiche Larven von *Culex* und *Mochlony*. Die Larven vom 20. März geben 1 ♀ und diese vom 13. März 2 ♂ von *A. bifurcatus*
9. April	+ 11° (3 Uhr	+ 13° nachm.)	Zahlreiche Larven und Nymphen von *Anopheles*	In einer Pfütze daneben sind winzige Larven von *Anopheles*, vielleicht eine neue Generation. Ueberall findet man Nymphen und kleine Larven von *Culex*. Entwickelung eines ♀ von *Culex* und mehreren *A. bifurcatus* bei den im Winter eingesammelten Larven
10. April	—	+ 12°	—	Bei den Larven, am 9. März eingesammelt, entwickelt sich ein ♀ von *A. bifurcatus*
12. April	+ 12° (4 Uhr	— nachm.)	Viele Larven und Nymphen von *Anopheles*. Mehrere sehr kleine Larven von *Anopheles*	—
18. April	+ 13°	—	—	Im Sumpfe von Boven (588 m) zahlreiche Larven und Nymphen von *Anopheles* (*A. bifurcatus*). 2 Larven von *Culex*
19. April	+ 12° (3 Uhr	— nachm.)	Larven und Nymphen von *Anopheles* weniger zahlreich	Viele erwachsene Culiciden in der Umgebung der in Beobachtung gestellten Pfütze
24. April	+ 14° (4 Uhr	— nachm.)	Nur einige Larven von *Anopheles* und *Culex*. Nymphen sehr zahlreich	In den anderen Pfützen nur wenige Larven, aber sehr viele Nymphen. Viele erwachsene Culiciden in der Umgebung
25. April	—	+ 11°	—	In den am 3. November eingesammelten Larven entwickeln sich *A. bifurcatus*
18. Mai	—	—	Einige große Larven von *Anopheles*, mit einer grünlichen Färbung	—
26. Mai	—	+ 15°	—	Von den am 18. Mai eingesammelten Larven erhält man *A. maculipennis* ♀
14. Juni	—	+ 11°	—	Von den am 9. März eingesammelten Larven erhält man ein sehr kleines ♀ von *Anopheles*, welches den Charakter von *A. nigripes* (?) aufweist

(Kanton Waadt) auf dem 46° 43'—46° 44' nördlicher Breite und auf einer Höhe von 442 m über dem Meere. Es war eine alleinstehende Pfütze, mit reichem Wachstume von Carex versehen, die Ufer besonders; während des Sommers und Herbstes hatten sich darin zahlreiche Larven von *A. bifurcatus* und *A. maculipennis* vorgefunden.

Wir stellen in voriger Tabelle die Ergebnisse der häufig in dieser Pfütze gemachten Beobachtungen dar und fügen auch einige Beobachtungen hinzu, welche in Pfützen der Umgebung angestellt wurden.

Die Durchschnittstemperaturen in Orbe während dieser Zeit waren die folgenden:

November	+ 2,46°	Februar	— 0,98°
Dezember	+ 1,33°	März	+ 4,67°
Januar	— 0,95°	April	+ 9,9°

Teilweise Beobachtungen wurden auch in anderen Sümpfen des Kantons Waadt während des Winters 1901—1902 gemacht mit folgenden Resultaten:

Sümpfe am Ufer des Genfer Sees bei Vidy (Lausanne) (375 m).

Vom 1. November bis Ende April wurden in diesem Sumpfe immer Larven von *Anopheles* und auch von *Culex* gefunden. Die Temperatur des Wassers variierte zwischen + 10° und + 1° und die Pfützen waren mehrere Male mit einer Eisschicht von 4—8 cm bedeckt. Am 28. November wurde in diesem Sumpfe noch eine Nymphe gefunden mit einer Lufttemperatur von 0° und einer Wassertemperatur von + 1°; die Eisschicht war 4 cm dick. Die ersten Nymphen erschienen am 27. März mit einer Wassertemperatur von + 10°, und von den während des Winters in dieser Gegend eingesammelten Larven erhielt man *A. bifurcatus.*

Die Durchschnittstemperaturen in Lausanne während dieser Zeit waren die folgenden:

	Durchschnitt	Maxima	Minima
November	+ 2,34°	+ 16,3°	— 5,0°
Dezember	+ 1,3°	+ 8,3°	— 3,5°
Januar	+ 1,26°	+ 11,0°	— 4,5°
Februar	+ 0,56°	+ 8,7°	— 7,5°
März	+ 4,92°	+ 15,9°	— 5,5°
April	+ 11,04°	+ 22,8°	+ 5,5°

Sümpfe bei Villeneuve (376 m).

Am 20. Februar, mit einer Lufttemperatur von + 4°, werden in einer mit dünnem Eise bedeckten Pfütze einige mittelgroße Larven von *Anopheles* und zahlreiche große und kleine Larven von *Culex* gefunden. Am 1. April, mit einer Lufttemperatur von + 12°, werden nur einige Larven und Nymphen von *Anopheles* und *Culex* gefunden. Die Larven, welche am 20. Februar gesammelt wurden, gaben *A. bifurcatus.*

Alle die oben vorgeführten Beobachtungen bestätigen gänzlich diejenige vom vergangenen Jahre: nämlich, daß die Larven von *Anopheles* wie die Larven von *Culex* in Pfützen, wenn auch dieselben mit Eis bedeckt sind, in großer Menge überwintern. Aber, wie auch letztes Jahr, hat man von keiner derjenigen Larven, welche während des Winters eingesammelt wurden, *A. maculipennis* erhalten, obgleich dieser sehr häufig im Sommer war in allen von uns beobachteten Sümpfen. Am

18. Mai nur fanden wir zum ersten Male in der über den Winter in Beobachtung gestellten Pfütze die ersten Larven von *A. maculipennis.* Ebenso, wie es Grassi für Italien behauptet, scheint es sicher zu sein, daß auch im Kanton Waadt die Larven von *A. maculipennis* nicht überwintern oder wenn es solche geben sollte, welche überwintern, diese doch sehr selten sein dürfen.

Besagte Beobachtungen bestätigen uns auch, daß die überwinternden Larven, mehr noch als während des Sommers, die Carex- und Schilfpflanzen mit Vorliebe aufsuchen. Inmitten dieser Vegetation kann man sie in Menge finden, während in derselben Pfütze, aber im freien Wasser, sie sehr selten oder gar nicht anzutreffen sind.

Auch ist es wichtig, zu bemerken, wie die Zeit des Erscheinens der ersten Nymphen der ersten erwachsenen Culiciden im Jahre 1902 beinahe mit diesem Erscheinen in 1901 zusammentrifft: die ersten Nymphen bildeten sich am 26. März (Wassertemperatur + 9°, Lufttemperatur + 6°) (im Jahre 1901 am 1. April mit einer Wassertemperatur von + 8,7°) und die erste Entwickelung von *A. bifurcatus* fand am 2. April statt mit einer Lufttemperatur von + 10° (in 1901 am 2. April mit einer Lufttemperatur von + 9,7°).

Eine sehr wichtige Thatsache ergiebt sich aus diesen unseren Beobachtungen: nämlich, daß die Eier der Culiciden überwintern zu können scheinen, auch auf einem inzwischen trocken gewordenen Boden. In einer Pfütze, welche vom 1. Dezember bis 1. Januar trocken gestanden und sich plötzlich mit Schneewasser angefüllt hatte, als durch die wärmere Witterung der in den ersten Januartagen gefallene Schnee geschmolzen war, fand man zahlreiche sehr kleine, wie eben dem Ei entschlüpfte, kaum sichtbare Larven von *Culex.* In diesem Falle muß das Vorhandensein der Larven in der Pfütze ausgeschlossen werden, da besagte Pfütze seit einem Monate ausgetrocknet war, ebenso das Eindringen von Larven aus einer anderen Pfütze, da, wie schon gesagt, die Pfütze gänzlich isoliert war. Die Thatsache kann auf zwei Weisen gedeutet werden: entweder stammen diese Larven von Eiern her, welche in den ersten Tagen des Januar durch *Culex*-Weibchen gelegt wurden, oder aber von Eiern, welche seit dem Herbste da gelegen: d. h. bevor die Pfütze trocken wurde. Die erste Voraussetzung scheint uns nicht zulässig, da die Pfütze sehr weit entfernt von Wohnhäusern liegt, wo erwachsene *Culex* am leichtesten hätten überwintern können. Uebrigens wurde die Anwesenheit von erwachsenen *Culex* nicht festgestellt, welche in den ersten Tagen des Januar über dem Wasser herumgeflattert hätten. Die zweite Annahme scheint die wahrscheinlichste zu sein, wenn man einige Thatsachen bedenkt, welche die Widerstandsfähigkeit der Eier an der Einwirkung des Austrocknens beweist. Ross legte nämlich *Anopheles*-Eier in einem Probierglas trocken, goß 5 Monate später Wasser dazu und erhielt Larven aus diesen Eiern. Grassi und Noè haben Eier von *Anopheles* gehabt, welche Larven lieferten, nachdem sie 12 Tage lang in einem Probierglase trocken gelegen hatten; Carroll, Agramonte und Lazear[1]) citieren auch den Fall von Eiern von *Stegomyia fasciata*, welche sich entwickelten, nachdem sie 30 Tage lang trocken gelegen hatten in einer ausgedünsteten Pfütze.

Zu gunsten der Ueberwinterung der Eier spricht auch die Thatsache, daß man öfters plötzlich im ersten Frühlinge winzige Larven von

1) Philad. med. Journ. 1900. p. 291.

Anopheles und *Culex* erscheinen sieht in solchen Pfützen, wo während des Winters keine aufzufinden waren, und zu einer Zeit, wo man keine erwachsenen Culiciden in der Umgebung der Sümpfe sieht. Diese Frage kann nur durch neue Untersuchungen aufgeklärt werden, welche den Grad der Widerstandsfähigkeit der Eier gegenüber den niedrigen Temperaturen feststellen.

Wir befassen uns mit Untersuchungen, um die Widerstandsfähigkeit der Eier von *Culex* an der Einwirkung verschiedener physikalischer und mechanischer Agentien zu erproben und geben wir hier, kurz zusammengefaßt, einige Resultate an, indem wir uns vorbehalten, alle unsere Beobachtungen in dieser Hinsicht in einer späteren Arbeit in extenso darzulegen.

1) Eier von *Culex* werden in ein Gefäß mit Wasser und in einen Eisschrank gebracht, wo sie 22 Stunden bleiben, mit einer Temperatur des Eisschrankes von 0° und des Wassers von + 0,5°. Nachdem diese Eier in die Zimmertemperatur zurückgebracht wurden, sobald das Wasser 10° Wärme erreichte, schlüpfen sie alle aus. Es sei bemerkt, daß die Temperatur des Wassers der mit Eis bedeckten Sümpfe zwischen + 0,5 + 1 + 1,5° wechselt.

2) Eier werden in ein Probierglas mit Wasser gelegt und dann in eine Kältemischung um 10½ Uhr morgens. Um 11¼ Uhr ist die Wassertemperatur 0°, um 11 Uhr 29 Minuten — 1°, um 1½ Uhr + 1°, um 6 Uhr abends + 2°. Am folgenden Morgen um 8 Uhr zeigt das Thermometer + 15° und alle Eier sind ausgeschlüpft.

3) Eier werden während 48 Stunden auf bloßes Eis gelegt, dann in Wasser gebracht in der Zimmertemperatur und nach 48 Stunden schlüpfen alle Eier aus.

4) Eier, am 23. Juni um 8½ Uhr auf feuchtem Löschblatt in eine Schale von Petri gelegt, schlüpfen am 25. Juni morgens aus. Am 26. Juni 10½ Uhr morgens wird dem Löschblatt Wasser zugegossen und die Mehrheit der jungen Larven wird wieder lebendig.

5) Eier werden in einem Probierglase trocken gelegt und schlüpfen nach einigen Stunden trotzdem aus.

6) Eier werden in einem Probierglase während 66 Stunden trocken gelegt im Keller bei einer Temperatur von 7°. Nachdem diese Eier ins Wasser gestellt wurden, schlüpften sie nach 24 Stunden aus.

7) Am 23. Juni, 8½ Uhr, wird ein Häuflein Eier in Wasser gestellt, welchem mittels einer Turbine sehr kräftige Schwingungen zugefügt werden. Alle Eier sinken um 10½ Uhr auf den Boden des Gefäßes und trotz der fortgesetzten Schwingungen des Wassers schlüpfen sie um 5 Uhr abends unter dem Wasser aus.

Diese Thatsachen scheinen zu gunsten einer großen Widerstandsfähigkeit der Eier an der Einwirkung verschiedener Zerstörungsursachen zu sprechen.

8. Juli 1902.

Nachdruck verboten.

Ueber eigenartige Parasitenfunde bei Syphilis.

Ihre Bedeutung für die Entstehung, Diagnose und Ausbreitung dieser Infektionskrankheit bei Erwachsenen und Kindern, sowie für die Beziehungen der Syphilis zu anderen Krankheitsprozessen.

Von Prof. Dr. **Max Schüller**, Berlin.

Mit 6 Tafeln.

(Schluß.)

Affektionen bei sekundärer und tertiärer Syphilis.

Von sekundärer Syphilis habe ich am Lebenden nur einmal Gelegenheit gehabt, die von mir entdeckten Parasiten in Form von großen, bräunlich-gelblichen Kapseln in dem ausgelöffelten Gewebe eines breiten Kondyloms an zerzupften, mit filtriertem Oel aufgehellten Präparaten nachweisen zu können. Leider wurde verabsäumt, an Mikrotomschnitten zu untersuchen, so daß ich über den Sitz und die Anordnung der Kapseln in den Kondylomen hier nichts aussagen kann. Auch bei einem während sekundärer Syphilis gestorbenen Patienten fanden sich in den Strichpräparaten der geschwollenen Milz kleine Reste von Kapseln und Maschenwerk, sowie vereinzelte junge Organismen. Besonders wünschenswert würden methodische Blutuntersuchungen am lebenden Patienten während der sekundären Periode der Syphilis sein, die ja gewiß von denjenigen, die über großes Material verfügen, in Kliniken u. s. w., außerordentlich leicht durchführbar sind. Ich habe nur 3mal von Patienten mit sekundärer Syphilis Blutpräparate — und infolge der äußeren Umstände nur Trockenpräparate — untersuchen können. Bei zweien fanden sich im Blute hellglänzende, vorwiegend kugelige Formen junger Organismen von verschiedener Größe, bei dem anderen einzelne mit mehr dunkelbräunlichem Protoplasma und deutlich radiär gestreiftem, doppelt konturiertem Randsaume (s. Taf. I, Fig. 5'). Es ist mir hiernach außer Zweifel, daß man sie auch im lebend erhaltenen Blute (im hängenden Tropfen) wird nachweisen können.

Dagegen habe ich wiederholt bei tertiärer Syphilis in exstirpierten Gummiknoten große Kapseln und junge Organismen in dem Granulationsgewebe eingebettet gesehen. In einem Falle von gummösen Herden des Unterhautbindegewebes am Fuße und besonders in der Sohlengegend bei einer 52-jährigen Frau waren sie auch bei den mehrfachen Recidiven in den frisch ausgelöffelten Massen, bei einfacher Untersuchung mit Kochsalzwasser, sowie in Schnitten der gehärteten Granulationen stets wiederzufinden. Auch hier würde eine methodische Verfolgung der Beziehungen zu den histologischen Veränderungen des gummösen Prozesses wünschenswert sein, welche ich infolge mangelnden Materials nicht durchführen konnte (s. Taf. IV, Fig. 33a und b).

Syphilisparasiten und Gelenkentzündungen.

So zahlreiche Fälle von Gelenksyphilis in der tertiären Periode ich im Laufe der Jahre gesehen und früher auch mehrfach pathologisch-anatomisch untersucht habe [1]), so stehen mir zu meinem Bedauern

1) Schüller, Max, Ueber syphilitische Gelenkentzündungen. (Verh. d. deutsch. Ges. f. Chir. Bd. II. 1882. p. 123). — Die Pathologie und Therapie der Gelenkentzündungen. Wien und Leipzig 1887. „Syphilitische Gelenkentzündungen".

jetzt keine Präparate mehr zur Verfügung, die ich nach meinen Parasiten hätte durchforschen können. Wohl aber ergab die Durchsicht meiner außerordentlich reichen Sammlung von mikroskopischen Präparaten über die von mir zuerst eingehend studierte Synovitis chronica villosa [s. meine Schrift „Polyarthritis chronica villosa" und „Arthritis deformans". Berlin (A. Hirschwald) 1900] in 5 Fällen unter 21 Gelenken (verschiedener Patienten) (s. Taf. IV, Fig. 34 a b c) die Anwesenheit von großen Kapseln wie auch von zahlreichen jungen Organismen mit zum Teil noch all den Charakteren, welche ich oben im Gewebe einer 4 Monate alten indurierten Ulceration beschrieben und in Fig. 31 und 32 abgebildet habe, sowie später aus verschiedenen hereditär syphilitischen Lokalprozessen mitteilen werde. In den vorwiegend mit Karbolfuchsin gefärbten Schnittpräparaten treten die jungen Organismen außerordentlich intensiv und viel dunkler gefärbt als Kugeln hervor, auf den ersten Blick zu unterscheiden von den umgebenden Gewebselementen. Aber nur an wenigen Exemplaren ist die früher angegebene Struktur und radiäre Streifung des Randsaumes noch deutlich, sowie ein Kerngebilde in ihnen zu sehen. Meist erscheinen sie ganz gleichmäßig tingiert. Am ungefärbten Präparate erweisen sie sich als etwas hellere, mattglänzende Scheiben, etwa wie aufgequollen (Taf. IV, Fig. 34 c). Daneben bemerkt man aber noch einzelne Exemplare mit vollkommen gut erhaltener Struktur, welche durchaus den oben beschriebenen Organismen gleichen. Weiterhin sieht man Uebergänge bis zu den fast strukturlosen gequollenen Formen. Nach meinen früheren Untersuchungen über die verschiedenen Veränderungen der jungen Organismen in Carcinomkulturen (l. c. p. 21. Fig. 7) sowie über die an Syphiliskulturen (s. unten) vermute ich, daß diese Aufquellung der Körperchen bis zur Bildung strukturloser Scheiben auch hier ein Zeichen des Absterbens ist und daß man es hier also wesentlich mit absterbenden oder abgestorbenen jungen Organismen der Syphilisparasiten zu thun hat. Uebereinstimmend ist auch die intensive Farbaufnahme der abgestorbenen jungen Parasiten in diesen Präparaten (s. Taf. IV, Fig. 34 a und b).

Es ist bekannt, daß früher öfter Syphilis als die Ursache der polyartikulären, chronischen, zottenbildenden Synovitis angenommen worden ist. Thatsächlich war bei dem einen oder anderen der von mir wegen dieses Gelenkprozesses operierten Patienten Syphilis vorausgegangen. Daß aber, wie ich schon früher nach den klinischen Erscheinungen mehrfach betont habe, keineswegs Syphilis als die Ursache dieses Gelenkprozesses angenommen werden kann, ergiebt sich auch aus dem Fehlen meiner Parasiten in den analogen Präparaten der übrigen Patienten, welche von mir wegen des gleichen Gelenkprozesses operiert worden waren. Augenscheinlich bildete bei den wenigen Patienten, in deren an Synovitis chronica villosa erkrankter Synovialis ich meine Syphilisparasiten in der angegebenen Form nachweisen konnte, die vorausgegangene Syphilis nur eine zufällige Gelegenheitsursache für die spätere Entwickelung des zottenbildenden Prozesses. Das erläutert nicht nur sehr gut der Befund der Syphilisparasiten in wesentlich abgestorbener Form, sondern die bekannte klinische Erfahrung, daß weder Jodkali, noch Quecksilbereinreibungen noch andere antisyphilitische Kuren irgend welchen heilenden Einfluß auf die chronische zottenbildende Gelenkentzündung haben. Ich habe letzteres an den weit über 200 Patienten, die ich mit diesem Gelenkleiden gesehen habe, immer wieder

bestätigt gefunden. Vorgängige syphilitische Gelenkerkrankung hat augenscheinlich keinen anderen Einfluß als den, den vorausgehende Gelenkprozesse haben können, indem sie nur eine gewisse Disposition schaffen für das Festsetzen oder für die Lokalisierung dieser zottenbildenden Gelenkentzündung. Sie sind aber ebensowenig eine notwendige Vorbedingung. Die chronische, zottenbildende Gelenkentzündung entsteht nach meinen Erfahrungen viel häufiger spontan resp. ohne daß irgend eine andere Gelenkentzündung oder irgend eines der bekannten Allgemeinleiden, wie Syphilis oder Tuberkulose, vorausging. Nach meinen Untersuchungen wird die chronische, zottenbildende Gelenkerkrankung bekanntlich durch einen bestimmten „hantelförmigen Bacillus" verursacht[1]). Was hier aber speziell interessieren dürfte, ist die hier zum ersten Male erwiesene Möglichkeit, vorausgegangene Syphilis durch die Anwesenheit von meinen Syphilisparasiten in den Geweben darzuthun. Vorläufig habe ich noch die histologischen Präparate von einigen anderen Gelenkprozessen aus meiner nicht kleinen Sammlung mikroskopischer Gelenkpräparate untersucht. Ich will nur bemerken, daß speziell die tuberkulösen Gelenkpräparate, die ich durchsah, frei davon waren. Ich kann darauf im einzelnen nicht eingehen. Wohl dürfte es eine lohnende Aufgabe sein, für die Folge durch den Nachweis dieser Parasiten die Beziehungen und den Anteil der Syphilis nicht nur an den bisher klinisch sichergestellten syphilitischen Gelenkprozessen, sondern an den verschiedenen anderen Gelenkkrankheiten darzulegen.

Syphilisparasiten und andere Organleiden.

Vielleicht wird man dahin kommen können, mittels dieses neuen, von mir angegebenen histologischen Nachweises meiner Parasiten die Beziehungen der Syphilis zu noch anderen Erkrankungen, zu verschiedenen Organleiden, sowie überhaupt ihre Verbreitungswege zu verfolgen. Ich erinnere hier nur an die Erkrankungen des Gehirns und des Rückenmarks und andere. Die Frage, ob und inwieweit z. B. Tabes im Zusammenhange mit Syphilis steht, würde vielleicht damit sofort entschieden werden können.

Syphilisparasiten und Lepra.

Im Anschlusse hieran führe ich an, daß sich auch in einem, in meinem Besitze befindlichen, sehr schönen, mit Orcein gefärbten Präparate von Lepra der Haut den eben geschilderten ganz ähnliche, verschieden große und kleine Kugeln oder Scheiben von runder oder ovaler Gestalt mit Randringen und zum Teil radiär gestreift vorfinden, so daß ich hier als eine Komplikation Syphilis anzunehmen nicht anstehe. Es wird sich empfehlen, Lepragewebe überhaupt darauf zu untersuchen, ob Syphilis ein Moment im Lepraprozeß bildet, wenn auch vielleicht nur in ähnlicher Weise, wie es oben von bestimmten Fällen der chronischen, zottenbildenden Polyarthritis ausgesprochen wurde. Vielleicht könnte mit dem Nachweise meiner Parasiten auch die alte Streitfrage, ob und inwieweit überhaupt alte Syphilis am Lepraprozesse beteiligt ist, zur Entscheidung gebracht werden. Der Wunsch, die Anregung zu dieser gewiß nicht unwichtigen Untersuchung zu geben, mag es entschuldigen, daß ich diese gelegentliche Beobachtung anführe.

---

1) Berl. klin. Wochenschr. 1893. No. 36 und Verhandl. d. XV. Kongr. f. innere Medizin. 1897. p. 127—141. Mit 3 Taf. Wiesbaden (J. F. Bergmann) 1897.

Die Parasiten bei hereditär-syphilitischen Lokalerkrankungen.

Das Beobachtungsmaterial von hereditärer Syphilis stand mir, wie das für den Chirurgen begreiflich, in viel reicherem Maße zur Verfügung, Ich habe seit $3^1/_2$ Jahren wiederholt Prozesse der Schädeldecken, gummöse Spina ventosa, gummöse Osteomyelitis und Periostitis der verschiedenen Skelettteile, mehrere Fälle von hereditärer Gelenksyphilis, auch sehr viele aus zerfallenen gummösen Herden entstandene multiple Abscesse der Haut und Muskeln, endlich mehrmals frisch excidierte, von vornherein als hereditär syphilitisch diagnostizierte Lymphdrüsen auf diese Parasiten untersucht und sie in allen Fällen nicht nur an frischen Zerzupfungspräparaten mit steriler Kochsalzlösung oder nach Oelaufhellung, sondern auch an Mikrotomschnitten mitten im Gewebe nachweisen können. Nach Mikrotomschnitten von solchen gummösen exstirpierten Granulationen liegen große Kapseln in allen Entwickelungsstadien teils einzeln, teils häufig in spiralförmigen Gängen reihenweise aneinander. Die Kapseln selber haben meist dieselbe zarte Hülle, Größe resp. Kleinheit, Form und Farbe, wie ich sie früher beschrieben habe. Man trifft hier auffällig häufig Körnchen-(Sporen-) und Brutkapseln, sowie auch junge Organismen in der Nachbarschaft im Gewebe verstreut. In allen Fällen, die — in einigen Fällen während eines bis fast zweier Jahre — darauf untersucht wurden, waren sie auch bei den Recidiven immer wieder nachweisbar, was besonders beachtenswert erscheint. Einige Male fanden sie sich dabei am cariösen Knochen in den Granulationen der lakunären Erosionen. Die nähere Beziehung dieser Parasiten zur Gummibildung, zur Eiterung und zur cariösen Zerstörung habe ich jedoch noch nicht genügend feststellen können, um hier sichere abschließende Angaben machen zu können (s. Taf. V, Fig. 35, 36, 37). Auch im frischen, in loco laesionis entnommenen Blute eines Kindes mit einer syphilitischen Spina ventosa fand ich, wahrscheinlich aus den Granulationen ausgetretene, große Kapseln. Sie sind hier sehr dunkel-bräunlichgelb, haben eine zarte Wand, die hier bei Immersion und nur undeutlich eine radiäre Streifung zeigt, auf der Oberfläche einzelne helle Punkte. Bei stärkster Vergrößerung erkennt man einen granulierten Kern von fast runder, leicht eckiger Gestalt. Die Abbildungen von zweien bei verschiedener Vergrößerung folgen hierbei (Taf. V, Fig. 38).

Interessant sind die Befunde bei hereditärer Gelenksyphilis. Von vielen solcher Fälle, die ich früher selber wiederholt [1]) nach ihren diagnostischen, anatomischen und klinischen Erscheinungen beschrieben habe, hatte ich Gelegenheit, besonders bei einem von mir am Kniegelenk operierten 8-jährigen Kinde, Synovialis und Knorpel eingehend auf die Parasiten zu untersuchen. Bei diesem Kinde mußte wegen einer akuten Entzündung des Kniegelenks mit bedeutendem Erguß und hohem Fieber im Anschluß an einen augenscheinlich zerfallenen Gummiknoten im Tibiakopfe operiert werden. Es wurde die sehr stark entzündete Synovialis und die erkrankte Stelle am Tibiakopfe mit dem benachbarten Knorpel entfernt mit dem Resultate vollkommener Heilung. In der frisch entleerten Flüssigkeit, die ich damals, um sie auf Bacillen

1) l. c. und früher Dtsch. Zeitschr. f. Chir. Bd. XIV. p. 385 sowie Ueber syphilitische Gelenkentzündungen. (v. Langenbeck's Archiv f. klin. Chir. Bd. XXVIII. Heft 2.)

zu untersuchen, gefärbt hatte, fanden sich zum Teil gefärbte Reste großer Kapseln und junge Organismen von verschiedener Größe mitten zwischen zahlreichen Blut- und Eiterkörperchen, zugleich neben einzelnen plumpen Stäbchen. Das Synovialisgewebe wurde in Alkohol gehärtet, in Celloidin eingebettet und an Mikrotomschnitten nach den verschiedenen, schon früher angegebenen Methoden, teils ungefärbt, teils gefärbt, untersucht. Hierbei fallen schon einige große Kapseln aus, welche verhältnismäßig klein, rundlich, zart und relativ hell erscheinen. Das erkrankte Gewebe stellt sich als ein einfaches, die Synovialis durchsetzendes Granulationsgewebe dar, an dem, wie man sieht, auch die endothelartigen Bindegewebszellen lebhaft Anteil genommen haben. Besonders schön fallen an den mit Oel oder noch besser an mit den oben genannten Salzlösungen aufgehellten ungefärbten Schnitten, bei guter Durchleuchtung von der Tiefe ausgehend bis zu der freien Fläche der Synovialis, die von mir beschriebenen Parasiten auf. In den tiefsten Schichten des Bindegewebes und Fettgewebes sieht man dicht von Bindegewebszügen umschlossene, große Kapseln, häufig mit jungen Parasiten im Inneren (Taf. V, Fig. 39 c). Sie lassen sich schon an der genauen Begrenzung, an ihrem Bau, dem Glanze und an der hellgelbbräunlichen Farbe erkennen. Nach der freien Fläche zu bemerkt man da und dort im Gewebe besonders einzelne relativ große, kapselartige Parasiten vom Charakter der jungen Organismen, an denen deutlich erkennbar ist der radiär gestreifte Randsaum, deren Inhalt entweder ein gleichmäßiges oder fein granuliertes, citronengelbes oder rötlichgelbes Protoplasma ist mit einem oder mehreren Kernen, zuweilen aber auch mit kleineren, jungen Organismen von hellerer, etwa citronengelber Farbe. Auch bemerkte ich noch hin und wieder einzelne, mit auffallend kleinen, glänzenden, hellgelblichen Körnchen gefüllt, „Körnchen- oder Sporenkapseln“ (wie *kk* in Fig. 46 c). Ebenso auch etwas derbere Gebilde deutlich vom Charakter der großen Kapseln, in gleicher Weise mit solchen glänzenden, gelblichen oder gelblichgrünen Körnern gefüllt. Alle diese Elemente sind in das Gewebe dicht eingebettet. Außerdem sieht man hier und da auch reihenweise hintereinanderfolgend ovale oder birnenförmige junge Organismen, und zwar bis zu den allerkleinsten (Taf. V, Fig. 39 b). Die Parasiten dringen bis zum freien Rande vor und man sieht nicht nur unmittelbar unter dem Randsaume verschiedene Formen der oben beschriebenen Parasiten, sondern man bemerkt sie sogar oft unmittelbar im Randsaume selber und zwar so, daß notwendigerweise einzelne derselben in den freien Gelenkraum hinein entleert werden müssen. Ich habe auch von dem eben besprochenen Befunde einzelne Typen abgezeichnet (Taf. V, Fig. 39 a b c). Man bemerkt in Fig. 39 a' einen kleinen, jungen Organismus eingeschlossen in einer Zelle auf der freien, nach dem Gelenkraume zugewendeten Innenfläche der Synovialis, in a'' ebendaselbst eine anscheinend schon geplatzte große Kapsel mit verschiedenen jungen Organismen, daneben noch eine andere partiell durchschnitten. Die jungen Organismen erscheinen bald größer, bald kleiner, zum Teil zwischen den Zellen, aber zum Teil zweifellos auch in den Zellen, wie auch aus meinen Abbildungen ersichtlich ist. Letzteres kann auch unter Umständen an gut gefärbten Präparaten beobachtet werden. Von einem solchen gebe ich die Abbildung eines Gefäßquerschnittes mit jungen Organismen in der Wandung (Fig. 39 e). Die Färbungen ergaben, beiläufig bemerkt, ähnliche Resultate, wie ich sie schon oben an den Schnitten der syphilitischen Primäraffektionen beschrieben

habe. Es kommen dabei besonders schön nicht nur die jungen Organismen in verschiedener Größe, sondern auch die eigentümlichen kleinen runden Kapseln, sowie die größeren kugelähnlichen Formen der jungen Organismen zur Erscheinung. Aus den geschilderten Verhältnissen wird es nun leicht begreiflich erscheinen, wenn ich hinzufüge, daß ich auch noch in einem Falle von Kniegelenkerguß auf zweifellos hereditärer syphilitischer Basis bei einem 4-jährigen Knaben in der punktierten Flüssigkeit diese beschriebenen rundlichen großen Kapseln und junge Parasiten in verschiedener Größe und verschiedenen Entwickelungsstadien fand (s. Taf. V, Fig. 39 d). Dieselben typisch geformten, jungen Syphilisparasiten fand ich in dem frisch entnommenen Zerzupfungspräparate aus einem hereditär syphilitisch erkrankten Handgelenk eines anderen Kindes (s. Taf. V, Fig. 40). Augenscheinlich hat man sich vorzustellen, daß junge Organismen oder Vorformen, die ich als „Körner" (Sporen?) bezeichnet habe, auf dem Wege des Blutes oder, was vielleicht für den einen Fall passen würde, von bestimmten Erkrankungsherden aus in die tieferen Schichten der Synovialis eindringen, da zunächst die weiteren Entwickelungsstadien durchmachen und dann als junge Organismen allmählich das gesamte Synovialisgewebe durchwandern, um schließlich auch in den Gelenkraum zu gelangen.

Daneben gebe ich (Taf. V, Fig. 41 a u. b) noch Abbildungen von einer kleinen sogenannten Knorpelulceration, deren Bedeutung für die Gelenksyphilis bekanntlich zuerst durch die Untersuchungen Virchow's festgestellt ist. Es ist ein Schnitt durch den Knorpel senkrecht zur freien Innenfläche, gefärbt mit Hämatoxylin. Die „Knorpelulceration" stellt sich als eine kleine Vertiefung der freien Fläche mit einer mittleren kleinen Erhöhung dar. Letztere zeigt bei stärkerer Vergrößerung zwischen den stark gewucherten Knorpelzellen junge Organismen in verschiedener Größe. Meist sind sie dunkel gefärbt, doch ist an einigen eine kleine Differenz der Farbe zwischen Protoplasma und Randsaum zu erkennen und an manchen sogar die Differenzierung nahezu so deutlich wie von einem der früheren Bilder angegeben. Hier waren auch einzelne leere Kapseln, von denen eine an einer Stelle mitgezeichnet ist.

Von den verschiedenen von mir untersuchten, zweifellos hereditär syphilitischen Drüsentumoren, welche ich am Lebenden exstirpiert habe, will ich nur kurz erwähnen, daß ich auch hier sowohl die großen Kapseln wie die jungen Organismen in ihren verschiedensten Entwickelungsstadien fand. Die Drüsen sind stets auch auf Tuberkelbacillen untersucht worden, die aber hier nicht nachzuweisen waren. Man sieht besonders in dem chronisch entzündlich infiltrierten Interfollikulärgewebe häufig kleinste, länglich ovale oder runde, junge Organismen, an denen besonders in den, wie früher angegeben, durch verschiedene wässerige Salzlösungen aufgehellten Präparaten Farbe und Struktur sehr klar hervortritt. Außerdem vermißt man aber auch nie solche Bildungen, die den mit jungen Organismen gefüllten runden Kapseln entsprechen. Sie sind von glänzender breiter Hülle umgeben, an der man nicht selten auch die früher geschilderte Struktur deutlich erkennt. Eine Abbildung von diesen verschiedenen Elementen gebe ich in Taf. IV, Fig. 42 a b c. Innerhalb der Follikel selber fand ich besonders die allerkleinsten Elemente und zwar vorzugsweise zwischen den Zellen. Es sind teils die kleinsten jungen Organismen, an denen bei starker Vergrößerung die Struktur gut zu erkennen ist, teils glänzende

rundliche oder längliche Körner, die übrigens auch an manchen Stellen hier und da zwischen den Gewebefollikeln zu bemerken sind. Sie sind ebenso auch reichlich vorhanden in der Nähe von gummösen Zerfallsherden. Die Parasiten in diesen Präparaten von hereditär syphilitisch erkrankten Lymphdrüsen (auch bei verschiedenen Patienten) gaben stets deutliche Hämosiderinreaktion (Fig. 42 c c'). Wie sich diese Parasiten zu den Zerfallsvorgängen, zur Verkäsung im Gewebe verhalten, wird gut ersichtlich aus einem mit Hämatoxylin gefärbten Schnitte, von dem ich ein kleines Bild in natürlicher Farbe beigebe (Taf. IV, Fig. 43). In demselben liegen eine .geplatzte große Kapsel und verschiedene junge Organismen mitten im Gewebe eingebettet, an welchen auch trotz der ziemlich intensiven Färbung mit Hämatoxylin die Struktur der einzelnen Elemente gut zu erkennen ist.

Faßt man diese Beobachtungen zusammen, so kann man, so unvollkommen sie leider noch in einzelnen Teilen bisher sind, doch wohl zugestehen, daß die von mir gefundenen Invasionsgänge mit bestimmten Parasiten in der syphilitischen Initialsklerose, das Vorkommen und die weite Verbreitung diesen ähnlicher Organismen bei den sekundären, tertiären und bei den hereditär syphilitischen Erkrankungen, bei den Recidiven, ihr enger Zusammenhang mit den typischen syphilitischen Veränderungen der Gewebe eine wesentliche ätiologische Bedeutung dieser Parasiten von vornherein sehr wahrscheinlich machen. Ob nun diese Parasiten allein an den spezifischen Gewebsveränderungen schuld sind, und ob sich nicht vielleicht, zumal an manchen Ausgängen, auch die begleitenden Bakterien beteiligen, bedarf weiterer Untersuchung. Unterstützt würde die Auffassung von der spezifischen Bedeutung der von mir gefundenen Parasiten gewiß durch Kulturen und noch mehr durch gelungene Tierexperimente. Ich kann aber auch hier nur über die ersten Anfänge und Versuche nach dieser Richtung berichten.

Kulturen von primär syphilitischen Indurationen und von einer primär infizierten Lymphdrüse, wie von hereditär syphilitischen Drüsen.

Es wurden dazu oft erst mit Sublimat desinfizierte, dann excidierte, harte Schanker ohne Abkühlung unmittelbar in geeignete sterile, runde, plattgedrückte Gläser oder Fläschchen und, in diesen steril verschlossen, mehrfach Kaninchen in die Bauchhöhle eingebracht. Die Bauchhöhle wurde nachher sofort durch Naht geschlossen und aseptisch zugeheilt. Sie diente nur als Brütofen. Nach 10—14 Tagen wurde sie wieder geöffnet, die Gläschen entfernt, dann aufs neue die Wunde geschlossen. Häufiger und für die Folge regelmäßig wurden größere, etwa fingerstarke, sterile, mit den syphilitischen Gewebsstücken beschickte Gläser, durch Gummistöpsel verschlossen, in einen Thermostaten gebracht, der konstant bei einer Temperatur von 37,5—38° C gehalten wurde. Die Gewebe werden hier regelmäßig sehr bald mißfarbig, grau bis schwarz, zerflossen aber meist nicht zu Brei, sondern behalten im allgemeinen ihre Form so, daß später von den meisten nach Alkoholhärtung und Celloidineinbettung Schnitte gemacht werden konnten (s. unten). Unterscheiden sie sich schon dadurch von den Kulturpräparaten bei Krebs und Sarkom, so auch noch durch einen ganz spezifischen, höchst widerlichen Geruch, der nicht dem gewöhnlichen Fäulnisgeruch ent-

spricht, durchaus anders als derjenige der Krebskulturen ist und außerordentlich hartnäckig selbst nach mehrfacher Hitzesterilisierung den Gläsern noch anhaftet. Es trat immer nur wenige trübe Flüssigkeit aus. Dieselbe enthielt außer Gewebströmmern die Parasiten in verschiedenen Entwickelungsstadien, welche ich gleich kurz beschreiben werde; daneben aber gewöhnlich noch Kulturen von Kokken und Bacillen verschiedener Form. So fanden sich einmal neben der Kultur der Parasiten dünne, lange, 2—3- und mehrfach gegliederte Stäbchen, zwischen den Bacillen zahlreiche Kokken einzeln und in Reihen und Haufen, einmal auch den Smegmabacillen ähnliche. Ich habe sie auch mehrfach gefärbt dargestellt, aber im übrigen nicht weiter verfolgt und will auch hier nicht weiter darauf eingehen. Diese Schistomyceten, welche bei den Kulturen aus Primäraffekten aus leicht begreiflichen Gründen niemals zu vermeiden sind, sind vielleicht die Ursache, daß es mir nicht gelang, die Parasiten aus solchen Kulturen für beliebige Zeit lebend zu erhalten. Diese Erfahrung konnte ich eben wieder bei einer während der Durchsicht dieser Arbeit gemachten Kultur aus einem von mir frisch exstirpierten Schanker der inneren Vorhautfläche bestätigen. Bei der ersten Untersuchung am 5. Tage erwies sich die Kultur meiner Parasiten als vorzüglich gelungen. Aber von da ab ging sie von Tag zu Tag zurück, indem die jungen Organismen mehr und mehr abstarben, während die Bakterien massenhaft zunahmen. Seltener fand ich die Parasiten als große Kapseln gut erhalten, mit gekörntem Protoplasma oder mit jungen, kleinsten Organismen innerhalb derselben; meist sind die großen Kapseln nur leer vorhanden, gefaltet und geplatzt. Einige in normaler, schöner Form habe ich in der beigegebenen Abbildung, Fig. 44, aus mehreren Kulturpräparaten zusammengestellt. Junge Organismen in der allerverschiedensten Größe bis zu den allerkleinsten herunter trifft man teils in runden Formen, teils in semmelähnlichen Doppelformen, zuweilen auch in länglich-ovaler Gestalt, bei welchen häufig zwei birnförmige nebeneinander verbunden sind. Die Farbe ist hier durchgehends hell schmutzig-grüngelb oder dunkelgrün-bräunlich, von mattem Glanze, nur bei guter Durchleuchtung stärker glänzend. Sie erscheinen äußerlich häufig wie von einem starken, dunklen Borstensaume umgeben und zuweilen von nicht ganz regelmäßig bogiger Begrenzung. Bei starker Beleuchtuug und langsam wechselnder Einstellung sieht man die doppelte Kontur der Hülle und auch, besonders an den großen, deutlich eine radiäre Streifung der Wandung sowie auf der gewölbten Oberfläche kleine, glänzende, etwas erhabene Punkte. In manchen ist der Kern oder auch mehrere deutlich zu sehen. Ich habe versucht, Abbildungen aus verschiedenen Präparaten in Taf. IV, Fig. 45 zu geben und zwar in a von einer 14 Tage alten, trocken eingeschlossenen Kultur, in b dagegen aus einer lebend im hängenden Tropfen beobachteten, 5 Tage alten Kultur. Bei a sieht man verschiedene Entwickelungsstadien, Doppelformen und sehr große junge Organismen mit Anlage von kleinen jungen Organismen, daneben solche von den allerkleinsten Formen. Die Trocknung und Einbettung läßt die Körper immer etwas mehr oder weniger geschrumpft, verzerrt, auch in Farbe etwas verändert erscheinen. In dem Bilde aus der lebenden Kultur (b) habe ich einige der größten Formen der jungen Organismen gezeichnet. Sie erscheinen dunkelgrün-bräunlich mit starken Borsten besetzt. Neben Doppelformen kommen große und kleine, einfach runde, genau gleich beschaffene vor. In den größeren jungen Organismen läßt

sich nicht selten die Anlage kleiner junger Organismen erkennen. Im hängenden Tropfen, auf dem erwärmten Objekttisch beobachtet, habe ich an diesen verschiedenen jungen Organismen deutlich träge, aber regelmäßig wiederholte Kontraktionserscheinungen, sowie auch eine mäßige Ortsbewegung wahrnehmen können. In x habe ich eine Gruppe kugelrunder, meist glatter, gequollener Körper von hellerer Farbe abgebildet, welche ich für Degenerations- oder Absterbeformen der jungen Organismen halte. Sie sehen genau so aus, wie die, welche ich früher nach Schnittpräparaten beschrieben habe, und treten um so reichlicher in der Kultur auf, je mehr die dunklen, borstigen Formen verschwinden. Außerdem lassen sich Uebergänge feststellen. Diese haben die charakteristische Struktur, sind aber heller, etwa so, wie ich sie oben aus dem Blute beschrieben und abgebildet habe. Solche kleinste Formen sind gewiß noch lebensfähig, was sich bei weiteren Untersuchungen würde feststellen lassen. Die abgestorbenen Formen bilden aber auch glänzende Blasen, mit Luft und einzelnen bräunlichen Bröckeln gefüllt.

Die vorherige Desinfektion des Schankers mit Sublimat vermeide ich jetzt auf das strengste, da das Sublimat die Kultur, zumal bei kleinen dünnen Stücken, verhindern kann. Es genügt die vorherige Reinigung mit sterilem Wasser.

Nach meinem bisherigen, freilich nicht sehr reichlichen Kulturmaterial aus diesen primären Indurationen scheint der Entwickelungsgang der Syphilisparasiten im allgemeinen ein ähnlicher zu sein, wie ich ihn von den Parasiten im Carcinom und Sarkom beschrieben habe. Aber es kommt neben der Entwickelung der jungen Organismen in dem Protoplasma der Kapseln augenscheinlich außerordentlich reichlich Körner- oder Sporenbildung und vielleicht auch häufiger die Vermehrung durch Teilung der jungen Organismen vor.

Sehr schöne Bilder gewähren die Mikrotomschnitte, welche ich von den zur Kultur verwendeten Initialsklerosen nach vorheriger Härtung und Celloidineinbettung gemacht habe und teils ungefärbt, bloß aufgehellt, teils in verschiedener Weise gefärbt, untersucht habe. In den mit wässerigen Salzlösungen (s. oben) aufgehellten sowie Rhodankaliumsalzsäure behandelten Schnittpräparaten, von welchen ich in Taf. VI, Fig. 46 a b c einige Abbildungen gebe, sieht man die Gänge und auch einzelne Gewebsspalten gefüllt mit den Parasiten in den verschiedensten Entwickelungsstadien. Man begegnet teils jungen Organismen in verschiedener Form und Größe, teils auch großen Kapseln, gefüllt mit solchen. Gerade in derartigen Präparaten kann man besonders schön die Struktur erkennen, während die Eigenfarbe bei manchen Salzlösungen mehr oder weniger abgeblaßt erscheint. Zugleich ergiebt sich aus diesen Untersuchungen, daß verschiedene dieser Parasiten blasig gequollen, also schon abgestorben, andere dagegen mehrfach degeneriert sind, wie ich wenigstens nach den analogen Veränderungen bei Carcinomkulturen annehme. Zuweilen sieht man auch kleine, zum Teil leere, doppeltkonturierte, ovale Blasen dicht aufeinandergeschichtet, ähnlich denen, wie sie schon bei Gelegenheit der frischen Schnitte und der Strichpräparate beschrieben wurden. An in Oelen aufgehellten Schnitten treten die jungen Organismen durchgehends viel dunkler, aber sonst in gleichem Farbentone hervor, welchen ich bei den Kulturen im Tropfen beschrieben habe. Die Struktur ist weniger klar. Man sieht aber dann sehr gut, in welcher ungeheueren Menge sie sich zu-

weilen entwickelt haben. Ueberall erscheinen die Gänge und Spalten dicht gefüllt und das umliegende Gewebe von ihnen überflutet. Leere, große Kapseln findet man nicht nur im Gewebe, sondern auch besonders an den Mündungsstellen der Gänge. Auch an z. B. mit Hämatoxylinalaun gefärbten Schnitten sind zuweilen die von uns am frischen Präparate beschriebenen Invasionsgänge in ausgiebigster Weise gefüllt, mit gefärbten jungen Organismen wiederzusehen und zwar trifft man sie hier augenscheinlich erheblich vermehrt, meist in einer feinkörnigen Masse an. In manchen dieser Präparate sind die Kerne der Zellen nirgends mehr gefärbt, zum Teil körnig zerfallen, zum Teil überhaupt nicht mehr deutlich zu sehen; gut gefärbt erscheinen nur die jungen Organismen, auch etwas das Protoplasma der Kapseln, soweit es noch erhalten ist. Dagegen ist die Struktur der jungen Organismen durch die Färbung in diesen Präparaten meist ganz undeutlich, verwischt. Anführen will ich noch, daß in manchen Präparaten die jungen Organismen innerhalb dieser Schnitte durch massenhafte Krystalle in Form kleinster Säulchen und Plättchen, die ich nicht näher bestimmen konnte, vollständig verhüllt sind.

Aehnliche Formen der jungen Organismen, aber sozusagen sauberer und feiner modelliert, fand ich in der sehr gut gelungenen Kultur, welche ich von der primär syphilitisch infizierten Lymphdrüse der Kinngegend (von einem Oberlippenschanker) unmittelbar nach der Exstirpation eingeleitet hatte. Sie sind auf Taf. VI, Fig. 47 zu sehen, hier allerdings wesentlich erst nach mehrmonatlichem Bestande der Kultur gezeichnet. Hier finden sich zahlreiche Brutkapseln vor, gefüllt oder geplatzt, von rundlicher oder polygonaler Form, aber auch von Birn- oder Spindelform. Diesen letzteren Aehnliches habe ich bei Carcinom und Sarkom oder sonst niemals gesehen. Ich möchte sie als typisch und besonders charakteristisch für die Kulturen der primär syphilitischen Parasiten ansehen. Man trifft sie so auch gelegentlich im Gewebe (s. oben). Daneben sind hier runde, junge Organismen und außerordentlich kleine, längliche Körper zu sehen, von welchen einige nach ihrem Bau zu den kleinsten jungen Parasiten gehören, die anderen aber wohl den „Körnchen" (Sporen?) aus gekörnten Kapseln gleichzustellen sind. Die Farbe ist hier dieselbe wie bei denen aus primären Indurationen; dagegen ist hier der Borstenbesatz viel geringer. Borstenbesetzte Parasiten waren vorher, bei den früheren Untersuchungen (s. Fig. a a) häufiger. Es erklärt sich zum Teil daraus, daß hier vorzugsweise Brutkapseln dargestellt sind, bei welchen er meist gering ist oder fehlt. In anderen Präparaten aus der späteren Periode sind besonders zahlreich die runden, jungen Organismen von verschiedener Größe bis zu den allerkleinsten. Auf der Tafel habe ich noch Reste fahlgraubraunen Maschenwerks, blasse, abgestorbene Degenerativformen, sowie leere Hüllen gezeichnet, welche sich bei den älteren Präparaten in großer Menge vorfanden und darthun, daß es sich hier um eine im Absterben begriffene Kultur handelt. An den absterbenden und abgestorbenen Parasiten tritt vielfach ein Kerngebilde deutlich hervor; bei anderen scheinen sich Vakuolen im Protoplasma gebildet zu haben. Ich habe wiederholt Versuche gemacht, diese Kultur auf verschiedene feste Nährböden fortzusetzen. Es ist mir thatsächlich gelungen, sie mehrfach auf einem aus Menschenblutserum zugerichteten Agar bei Körpertemperatur zur weiteren Entwickelung zu bringen, Versuche, welche ich gelegentlich wieder aufnehmen werde. Die primär infizierten Drüsen

dürften jedenfalls in der Folge für die Gewinnung von Kulturen unserer Parasiten den Initialsklerosen selber vorzuziehen sein.

Mehrmals habe ich Kaninchen mit primär luetischer Kultur an der Basis des Ohrinnern subkutan geimpft. Regelmäßig hatte sich in loco anfänglich Rötung und eine fühlbare Schwellung gebildet, welche aber nach wenigen Wochen sich wieder vollkommen verlor. Die Tiere waren anfänglich etwas elend, hatten Durchfall, erholten sich dann und blieben gesund. Bei einem Tier entwickelte sich später ein eigenartiger Ausschlag, der sich über Nase und Schnauze verbreitete. Das Tier war im übrigen vollkommen gesund. Bei der Obduktion des $^{3}/_{4}$ Jahr später getöteten Tieres wurde nichts Pathologisches gefunden. Auch der Ausschlag stand in keinem Zusammenhang mit diesen Parasiten, sondern war durch eine Milbenart bedingt.

Von den frisch excidierten hereditär syphilitischen Lymphdrüsen habe ich auch sehr gut gelungene Kulturen gewonnen. Ich habe dieselben vielfach lebend im hängenden Tropfen studiert. Man trifft die verschiedenen Entwickelungsstadien der Parasiten sowohl der großen Kapseln wie der jungen Organismen an. Letztere zeigen fast ausschließlich runde kuglige Formen von hellgelblichem, hellgrünlichgelbem oder bräunlichem Farbenton, in teils dicht aneinander hängenden Gruppen, teils in mehr lockeren Haufen, in denen vorzugsweise die allerkleinsten Exemplare besonders zahlreich vertreten sind An den jungen Organismen erkennt man bei wechselnder Einstellung die kuglige Form, auf der Oberfläche dunkle und helle Punkte oder auch feine Unebenheiten, zuweilen kurze zarte Borsten, zumal an den größeren jungen Organismen bei bestimmter Einstellung eine doppeltkonturierte Wandung und in dieser eine radiäre Streifung, d. i. abwechselnd helle und dunkle radiäre Streifen von scharfer Zeichnung. Dieselben sind der optische Ausdruck von Poren der Hülle, durch welche am lebenden Individuum aus dem hellen protoplasmatischen Inhalte feine flottierende Fädchen hervortreten, ähnlich dem, wie ich es von den lebenden jungen Organismen bei Carcinom und Sarkom beschrieben habe. Die Vermehrung erfolgt auch hier ebenso durch Teilung wie auch durch Neubildung in Körnchen- und Brutkapseln. Die Kulturen ähneln infolge der zahlreichen kleinsten Formen etwas denen, welche ich bei Sarkom beschrieben habe (s. Fig. 48, 49, 50). Sie kommen ihnen jedenfalls näher, wie denen aus Carcinom. Nach Prüfung verschiedener Farben auf diese Kulturen ließ Hämatoxylin bei vorsichtiger Färbung die Struktur der jungen Organismen noch sehr gut erkennen. Karbolfuchsin färbt sie auch, verwischt aber den feineren Bau derselben. 5-proz. Kalilauge hellt sie auf, zerstört sie schließlich, läßt aber vorher deutlich die radiäre Streifung des doppelten Randsaumes hervortreten. Gehärtete und in Celloidin eingebettete Mikrotomschnitte von diesen zur Kultur benutzten hereditär syphilitischen Drüsen geben ein sehr anschauliches Bild von der Parasitendurchsetzung. Junge Organismen in meist kugelrunden Formen und in allen Größen von den allerkleinsten bis zu den großen charakteristischen Formen, in denen wieder „Körner“ (Sporen?) oder kleinste junge Organismen enthalten sind, nehmen das in eine feinkörnige, nur da und dort nach den Bindegewebszellzügen leicht streifige Masse umgewandelte Gewebe fast vollkommen ein. An den größeren jungen Organismen ist stets bei entsprechender Behandlung oder Färbung deutlich die doppelt konturierte Wandung, oft auch die radiäre Streifung, im Protoplasma auch der Kern

zu sehen. Große Kapseln sind nur an wenigen Stellen in Gewebslücken, aber leer und zusammengefaltet, angehäuft. Von den Zellen ist kaum etwas zu erkennen. Wohl aber finden sich noch einzelne dicke Bacillen und Kokken vor.

Von den Kulturen, welche frei von Fäulnis blieben und sich im übrigen wochenlang lebend erhielten, wurden einige Kaninchen an verschiedenen Stellen geimpft, jedoch insofern erfolglos, weil sie sehr bald, aber anscheinend nur wegen ungünstiger lokaler Verhältnisse starben. Nur einen Versuch von längerer Dauer erwähne ich, wo ich bei einem Kaninchen in die rechte Niere mittels steriler Spritze ein paar Tropfen von dieser Kultur, vermischt mit steriler Kochsalzlösung (unter Vermeidung der Abkühlung wie der Erwärmung über 37,5° C) injiziert hatte. Das Tier starb $^{3}/_{4}$ Jahr später, nachdem es zuletzt etwas abgemagert erschien. Die rechte Niere ist äußerlich kleiner als normal, jedenfalls auch kleiner als die anscheinend nicht affizierte linke Niere und zeigt an der Oberfläche verschiedene deutliche narbige Einziehungen. Teils an ungefärbten, teils an gefärbten Mikrotomschnitten sowohl parallel des Dickendurchmessers wie parallel des Längendurchmessers bemerkt man einzelne größere Haufen und ebenso reihenweise Einsprengungen von stark pigmentierten und inkrustierten jungen Organismen. Da und dort auch einzelne große Kapseln. Diese dunkelbraun, fast schwarz gefärbten jungen Organismen sitzen vorzugsweise längs der Gefäße und auch vielfach innerhalb der Kapseln einzelner Glomeruli. In größeren Massen sind sie außerdem diffus verstreut über das Nierengewebe. Die Feststellung, daß es sich in diesen pigmentierten Massen thatsächlich um diese Parasiten handelt, habe ich in derselben Weise ausgeführt, wie ich es früher in meinem Buche „Die Parasiten im Krebs und Sarkom des Menschen“ beschrieben habe. Außer diesen pigmentierten Massen, die übrigens vielfach anscheinend abgestorbene Parasiten sowie leere Hülsen von jungen Organismen enthalten, finden sich aber noch zahlreiche nicht pigmentierte junge Organismen meist zwischen den Zellen, aber zum Teil auch in den Zellen verstreut innerhalb der Niere. Sie erscheinen hier an ungefärbten Schnitten in der früher beschriebenen natürlichen Farbe und Struktur und lassen sich auch durch die verschiedensten Färbungen nachweisen. Was das Gewebe betrifft, so bemerkt man nur da, wo große Parasitenherde liegen, einzelne Züge narbigen Bindegewebes, diese setzen sich auch in der Umgebung einzelner Harnkanälchen fort. Manche dieser Narbenzüge verlaufen schräg über die Kanälchen und haben so zu partiellen Strikturen oder Abschnürungen geführt. Wo reichlichere Einsprengungen der jungen Organismen sind, erscheinen die Epithelien in den Harnkanälchen etwas körnig trübe, der Kern etwas weniger deutlich. Im übrigen sind sie kaum verändert. Irgend welche Proliferationserscheinungen fehlen, und speziell sind diejenigen Veränderungen, welche ich nach der Injektion mit Carcinomkulturen in der Niere beobachtete und beschrieben habe, absolut nicht vorhanden. Aber auch in der Leber sind zahlreiche junge Organismen und Kapseln vorhanden. Man sieht sie hier gleichfalls wesentlich in pigmentierten Konglomeraten, aber auch in ihrer natürlichen Farbe, und außerordentlich reichlich verstreut im Lebergewebe. Am Lebergewebe sind die Veränderungen etwas bedeutender. Das Protoplasma der Zellen ist feinkörnig trübe, die Konturen verwischt, auch die Kerne blaß, weniger gut zu färben. Zwischen den Leberzellen sind Rundzellen nur wenig, um so mehr junge Organismen zu bemerken.

Narbig verändertes Bindegewebe ist nur an einzelnen wenigen Stellen in der Umgebung der Gefäße und nahe der peritonealen Decke vorhanden; größere Anhäufungen fehlen jedenfalls. Hier, wie in der Niere, liegen zweifellos einzelne Parasiten innerhalb der Blutgefäße, umschlossen noch von dem das Gefäßlumen füllenden Blutgerinnsel. Die großen Kapseln und die jungen Organismen, sowohl pigmentierte wie unpigmentierte, geben in allen diesen Präparaten sehr stark die Hämosiderinreaktion.

Aus diesen wenigen Versuchen, welche fortzusetzen und nach verschiedenen Richtungen besser durchzuführen mich zu meinem Leidwesen die Ungunst der Verhältnisse hinderte, ergiebt sich wenigstens das, daß die Parasiten von der Injektionsstelle aus sich auf andere Organe ausbreiten und im Tierkörper fortkommen können, wenngleich augenscheinlich eine große Zahl in dem fremden Nährboden zu Grunde geht. Man sieht zugleich, daß sie ganz anders auf die Gewebe einwirken, als ich es von meinen Sarkom- und Carcinomkulturen beschrieben habe.

Nach allem von mir bisher Beobachteten bilden die von mir bei Syphilis gefundenen Parasiten wahrscheinlich eine besondere Abteilung oder Species der bisher noch unbekannt gebliebenen großen Gruppe niederer tierischer Lebewesen, von welchen eine andere große Abteilung die von mir bei Carcinom und Sarkom gefundenen Organismen darstellt. Die Syphilisparasiten scheinen auch ganz streng an bestimmte Lebensbedingungen und vielleicht sogar ausschließlich an den Menschen als Nährboden oder Wirt gebunden zu sein. Wäre dies nicht der Fall, so würde augenscheinlich gewiß längst schon die Uebertragung auf das Tier gelungen sein. Beide Parasiten sind aber trotz mancher Uebereinstimmung in dem Schema der Entwickelung doch nicht nur in ihrer Form und in den Details der Kultur, sondern auch in der Einwirkung auf das Gewebe wesentlich voneinander unterschieden. In dieser Beziehung läßt sich auch erkennen, daß sie bei manchen äußerlichen Aehnlichkeiten mit den Sarkomkulturen selbst nicht mit diesen zu identifizieren sind. Aber auch innerhalb des menschlichen Körpers erscheinen sie in vielen Einzelheiten anders als die Parasiten beim Krebs und Sarkom, und weichen noch mehr in ihrer zeitlichen Entwickelungsweise innerhalb desselben und in ihrer Einwirkung auf die Gewebe, sowie auf die Gewebssäfte, Blut und Lymphe, auf die einzelnen Organe von jenen ab. Augenscheinlich machen sie mit den verschiedenen Perioden der Syphilis zusammentreffende besondere neue Entwickelungsschübe durch, worüber am Patienten selber durch Untersuchung des Blutes und der erkrankten Teile noch genauere Aufschlüsse zu gewinnen sind. In dieser Beziehung ist es schon jetzt von Interesse zu sehen, welche verschiedenen Phasen die von mir gefundenen Parasiten bei der Syphilis von der ersten Infektionsstelle bis zur hereditären Syphilis zu passieren haben.

Zu der Annahme, daß wir in ihnen die wesentlichen Infektionserreger und Träger des Syphilisgiftes zu sehen haben, drängt nicht nur die anatomische Anordnung und Verteilung der Parasiten in der primären Induration, aus welcher man erkennen kann, daß sie hier durch eine oberflächliche erodierte oder verletzte Stelle der Epidermis in den Körper eindringen, sondern die Ausbreitung im Körper während aller Stadien dieser Infektionskrankheit. Daß die an der Stelle der primären

Infektion miteindringenden Bacillen und Kokken eine wesentliche Bedeutung für die Genese der Syphilis als solcher haben sollten, ist mir zweifelhaft; denn sonst würde die Uebertragung dieser Spaltpilze, deren Kultur ja keinen besonderen Schwierigkeiten unterworfen ist und selbst von abgekühlten Präparaten gelungen ist (!), die also augenscheinlich nicht annähernd an so enge Grenzen für ihre Lebensbedingungen geknüpft sind wie die Parasiten, längst das Problem der experimentellen Erzeugung der Syphilis beim Tier gelöst haben. Einen endgültigen Beweis für die Ausschließlichkeit der von mir gefundenen Parasiten als Erreger der Syphilis und aller syphilitischen Erscheinungen wird ja allerdings auch erst durch die erfolgreiche Uebertragung der Kultur erbracht werden können. Doch wird man hierzu, die Möglichkeit angenommen, erst noch besser geeignete Tiere zu finden haben, als sie mir bisher zur Verfügung standen.

Daß bei Tieren überhaupt Syphilis spontan vorkommt, wird, entgegen einer verbreiteten volkstümlichen Vorstellung, von kompetenten Fachleuten auf das entschiedenste verneint. Ich habe keinen Grund, die Erfahrung der Tierärzte zu bezweifeln. Vergegenwärtigt man sich, daß die Syphilis so ausschließlich wie wenig andere Infektionskrankheiten seit Jahrhunderten nur vom Menschen zum Menschen übertragen und fortgepflanzt wird, so läßt sich voraussetzen, daß auch die von mir nachgewiesenen Syphilisparasiten sich den ihnen vom menschlichen Blute und von den menschlichen Geweben und Gewebssäften gebotenen Ernährungsbedingungen auf das engste angepaßt haben. Ob dies so weit geht, daß auch die Uebertragung auf andere Tiere unmöglich ist, muß die Folge lehren.

Vielfache Versuche, die Syphilis überhaupt auf Tiere zu übertragen, sind ja schon zu allen Zeiten gemacht worden. Brieger und Uhlenhuth, welche im Jahre 1893 ganz erfolglose Uebertragungsversuche an Ziegen, Meerschweinchen, Hühnern, Fröschen und Salamandern machten, haben ihrer Mitteilung darüber (im „Klinischen Jahrbuch“. Bd. VII. 1900. p. 193. Jena, Gust. Fischer, 1900) eine kurze historische Zusammenstellung aller einschlägigen höchst zahlreichen Versuche vorausgeschickt, auf welche hier verwiesen werden kann. Frühere gelungene Uebertragungen wurden behauptet von Bradley (Meerschweinchen und Katze), von Legros (Meerschweinchen), von Klebs (bei einem Affen). Aus der neuesten Zeit beanspruchen ein besonderes Interesse die Uebertragungsversuche auf Schweine, welche von Adrian (s. Arch. f. Dermatologie und Syphilis. Bd. XLVII. p. 163), von Hügel und Holzhauser (ebendaselbst. Bd. LI. p. 225), von Neisser (ebendaselbst. Bd. LIX. p. 163) u. A. mitgeteilt worden sind. Es wurde den Tieren entweder abgekratzter Sklerosensaft auf die Brustwarze oder in die Haut eingerieben, oder eine frisch excidierte Initialsklerose oder eine syphilitische Papel in oder unter die Haut eingenäht, oder endlich Blut von sekundär syphilitischen Menschen unter die Haut gespritzt. Adrian beobachtete an der Stelle der Inokulation Infiltrationen, Geschwüre und am Körper disseminierte, makulöse, papulöse, weiterhin zerfallende Efflorescenzen. Hügel und Holzhauser beobachteten an einem der geimpften Schweine Inguinaldrüsenschwellung und papulöse Efflorescenzen und fanden dann bei der Sektion Verhärtung und Vergrößerung der Lymphdrüsen an der Wirbelsäule, Induration in Lunge und Leber sowie eine interstitielle Hepatitis. Bei zwei mit Blut geimpften Schweinen wurden nur papulöse Exantheme, bei den

anderen nichts beobachtet. Neisser, der über weitaus die größte Anzahl (18) von Versuchen an Schweinen verfügt, beobachtete bei einem der 7 mit frischem Syphilisblute geimpften Schweine einen vorübergehenden großblasigen Ausschlag auf dem Rücken; doch blieb dieses wie alle übrigen Tiere gesund. Von dem mit dem Sekret einer Primäraffektion, oder noch häufiger durch Einnähen eines frisch excidierten Primäraffektes resp. einer frischen Papel geimpften 8 Schweinen erkrankte nur eins, dem eine frisch nässende Papel vom Präputium eines Syphilitikers mit „Lues maligna“ in die Vagina eingenäht worden war. Dieselbe heilte per primam ein, hatte weder lokale Induration noch Drüsenanschwellung zur Folge. Etwa 2 Monate später erschien ein papulöses und circinäres Exanthem, mit kleinem und später, nach Abheilung derselben, mit einem größeren Nachschub. Das Tier blieb im übrigen gesund; ebenso 3 Schweine, welche erfolglos mit dem Sekret der Efflorescenzen des vorigen Schweines geimpft worden waren. Während Hügel und Holzhauser mit ihren Erfolgen glauben, die Syphilis auf Schweine übertragen zu haben, verhält sich Adrian gegen seine eigene Beobachtung, Neisser nicht nur gegen sein eigenes, in gewissem Sinne positives Ergebnis, sondern auch gegen diejenigen von Hügel und Holzhauser skeptisch und meint, daß die Frage der Uebertragung der Syphilis auf Schweine noch offen sei. „Indessen muß ich gestehen, daß, wenn auch weder die klassischen Erscheinungen der lokalen syphilitischen Infektion noch auch der typische Verlauf und das klinische Bild der Syphilis genau wie beim Menschen reproduziert wurde, diese wenigstens teilweisen Ergebnisse doch recht bemerkenswert erscheinen. Es könnte sehr wohl das Virus im Tier abgeschwächt worden sein, Blut und Gewebe des Schweines wesentlich verändernd auf dasselbe einwirken und daraus der unvollständige Effekt zu erklären sein. —

Aber es ist doch noch an etwas anderes zu denken. Wenn man mit mir die Ueberzeugung hat, oder auch nur die Wahrscheinlichkeit anerkennt, daß die von mir gefundenen, kultivierten und durch alle Stadien der Syphilis verfolgten, und sogar bei hereditärer Syphilis nachgewiesenen Parasiten die Infektionsträger der Syphilis sind, so ist bei allen Tierversuchen die zuerst zu erfüllende, wichtigste Bedingung die, daß die Syphilisparasiten auch lebend übertragen werden. Fragen wir, ob die vielen bisherigen Uebertragungsversuche von Blut oder erkrankten Gewebsbestandteilen dieser Forderung gerecht geworden sind, so muß das gewiß in hohem Grade bezweifelt werden. Die bloße Injektion frisch entnommenen Blutes oder selbst die Einheilung einer frisch excidierten Sklerose bietet keine Garantieen dafür, daß noch lebende und infektionsfähige Parasiten in irgend welcher Form im verimpften Materiale enthalten waren. Wahrscheinlich sind die Syphilisparasiten ebenso, wie ich es zuerst von den Krebsparasiten dargethan habe, in ihrer Lebens-, Infektions- und Vermehrungsfähigkeit wesentlich gebunden an die Erhaltung auch der Körpertemperatur des Menschen. Diese verlieren diese Eigenschaften und sterben ab, sowie sie, sei es auch nur momentan, unter dieselbe abgekühlt oder darüber erhitzt werden. Welche große Umsicht dies zu verhüten erfordert, darauf habe ich oft schon betreffs der Gewinnung von Kulturen meiner Parasiten aus Krebs hingewiesen. Gegen eine gleiche Empfindlichkeit der Syphilisparasiten scheint freilich die wiederholt betonte Erfahrung von der Syphilisübertragung durch die ver-

schiedenartigsten Gebrauchsgegenstände zu sprechen. Welche besonderen Verhältnisse bei einer derartigen Syphilisübertragung obwalten, darauf wird man in der Folge genauere Aufmerksamkeit zu richten haben. Jedenfalls scheint es mir aber geboten, nicht nur bei der Wiederholung der Kulturen meiner Parasiten die gleiche Vorsicht keinen Moment außer acht zu lassen, wie sie für die Gewinnung der Krebskulturen unerläßlich ist, sondern auch bei der Wiederholung der Uebertragungsversuche mit Blut, Gewebsbestandteilen und infektiösen Sekreten von Syphilitikern. Die Uebertragung derselben in das Kulturgefäß oder auf das Tier muß unmittelbar und unter Vermeidung jeder Möglichkeit der geringsten Abkühlung (oder Erhöhung über Körpertemperatur), natürlich auch unter Ausschließung jeder fremden Verunreinigung geschehen. Unter Beachtung dieser Momente ist es gewiß zu empfehlen, die Uebertragungsversuche nicht nur mit syphilitischem Rohmateriale, sondern auch mit gut gelungenen Kulturen der von mir gefundenen Parasiten planvoll unter verschiedenen Bedingungen bei verschiedenen Tieren, besonders auch bei dem dem Menschen näherstehenden Affen wiederaufzunehmen.

Verzeichnis und Erklärung der Abbildungen.

Fig. 1, 2, 3, 5. Aus Deckglaspräparaten von der Oberfläche verschiedener syphilitischer primärer Indurationen s. Initialsklerosen. Fig. 1 bei Messter 2. 4; Zeiss 4. A. Fig. 2 bei Zeiss 4. DD. *k* große Kapseln mit hellgelblichem glatten Randsaum und dunkelgelbbräunlichem Protoplasma, Kern nicht zu erkennen, auf der Oberfläche kleine knopfförmige Erhöhungen. *p* hüllenloses dunkelbräunliches Protoplasma, das eine mit deutlichem Kern. *kl* leere, zum Teil gefaltete Hüllen großer Kapseln, blaßgelblich oder fast farblos.

Fig. 3. Junge Organismen. Zeiss 4. DD. 3a runde junge Organismen verschiedener Größe, grünlichgelb, mit deutlich radiär gestricheltem, doppelkonturiertem Randsaum, daneben einige kleine, ähnlich gefärbte „Körner". 3a[1] dunkelgrünlichgelbe übereinander geschichtete leere Hüllen junger Organismen mit fast schwarz erscheinendem doppelkonturiertem Rande; daneben ein zerrissener, runder, junger Organismus. 3b leere resp. abgestorbene fahlgraue Doppelformen junger Organismen aus einer ulcerierten, vorher mit Kalomel behandelten primären Induration. Messter Immersion $^1/_{12}$.

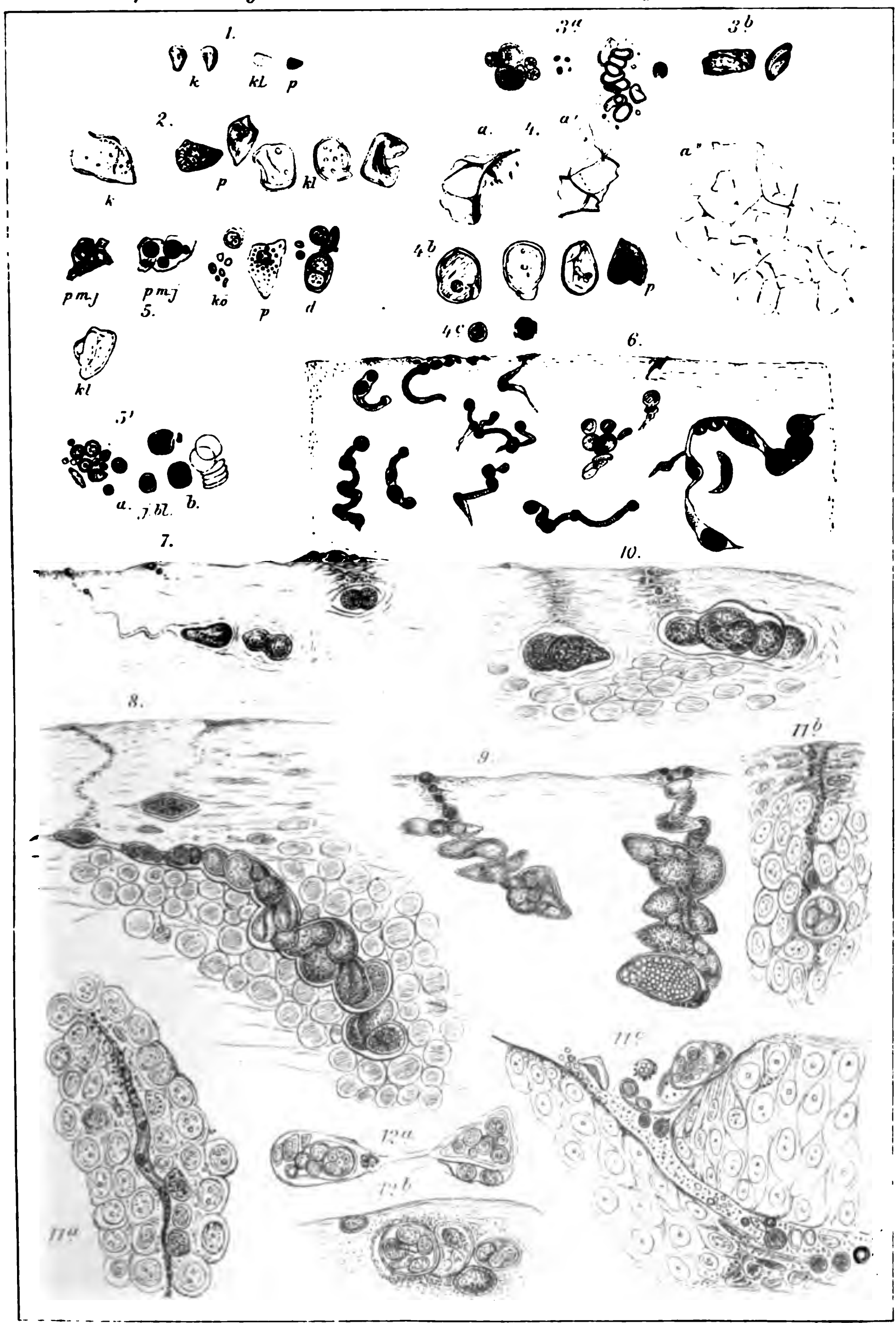
Fig. 5. Aus Deckglaspräparaten der Oberfläche einer älteren ulcerierten Initalsklerose. *p m j* Protoplasma (aus großen Kapseln) mit jungen Organismen. dunkelbraun. *Kö* hellglänzende, runde oder längliche Körnchen, auch in Zelle. *p* Protoplasma mit Kern in körnigem Zerfall. *d* Doppelform junger Organismen, blaß, abgestorben (?), aber mit noch erkennbarer Struktur. *hl* leere blasse große Kapsel etwas verletzt.

Fig. 4. Aus Deckglaspräparaten von der Schnittfläche verschiedener syphilitischer Initialsklerosen. *a* Maschenwerkrest, fahlgrau. a' ein anderer, etwas heller. a" ein anderer, hellgelblich, Zwischenwände farblos. b große Kapseln, eine mit Kern. *p* Protoplasma, gelblichbraun glänzend oder mit mattem Farbenton. *c* lädierte junge Organismen, letztere sind oft mehr oder weniger unregelmäßig verzogen.

Fig. 5'. *j bl* a junge Organismen aus dem trockenen Blutpräparat eines Patienten mit sekundärer Syphilis, glänzend hellgelblich, mit doppeltkonturiertem Randsaum, jedoch nicht deutlicher oder nur angedeuteter radiärer Strichelung. b aus dem trockenen Blutpräparate eines anderen Patienten bei sekundärer Syphilis, junge Organismen mit dunkelbraungelbem Protoplasma und hellglänzendem deutlich radiär gestreiftem Randsaum; daneben die Konturen einiger roter Blutkörperchen. Messter Immers. $^1/_{12}$. Aehnliches bot das Blut eines dritten kürzlich untersuchten Patienten mit florider sekundärer Syphilis.

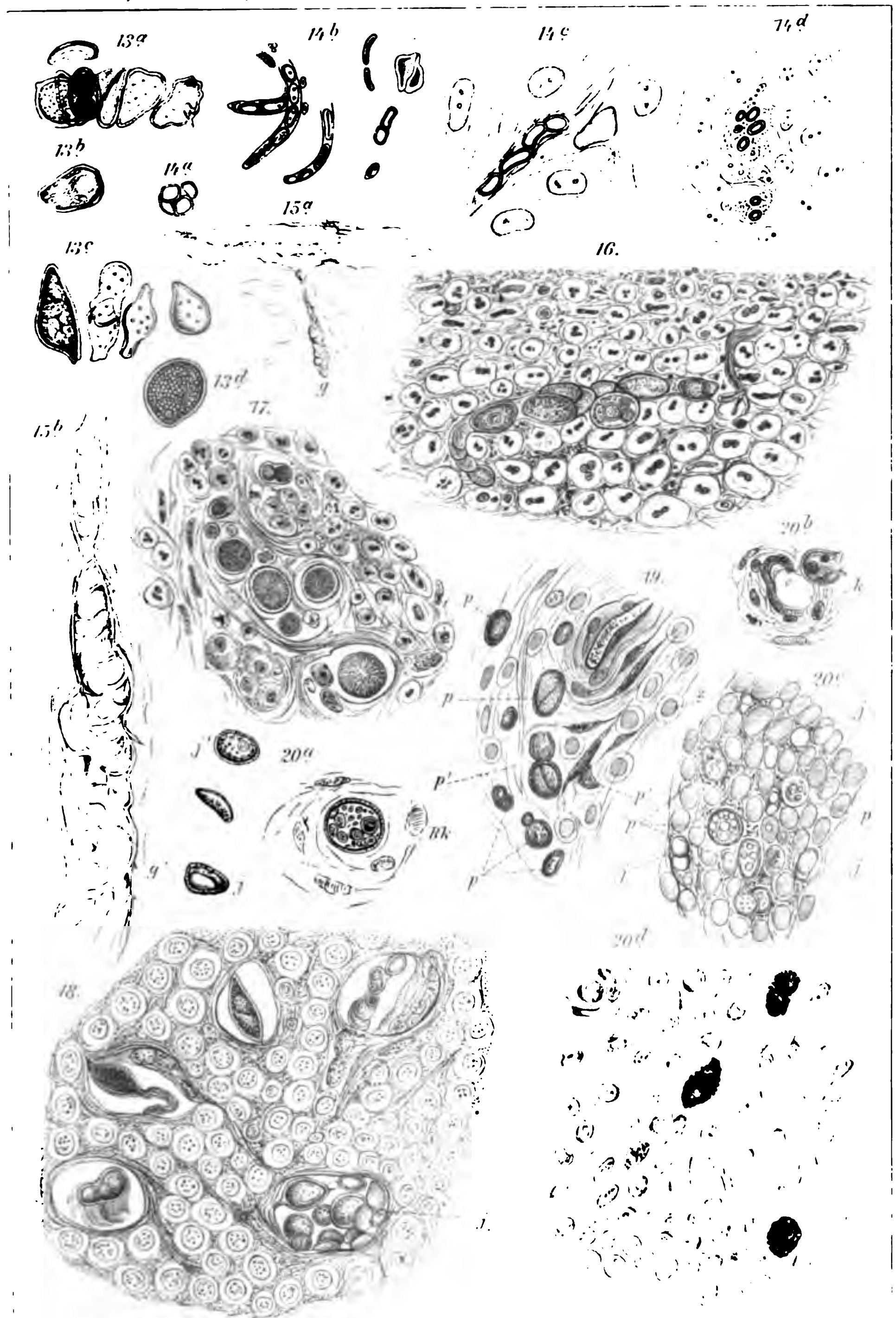
Figg. 6—10. Mittelpartie aus primär syphilitischen Indurationen der Vorhaut. Vorher mit Jodjodkalilösung behandelte, mit Lavendelöl aufgehellte, in Xylolbalsam eingeschlossene Schnitte. Fig. 6 ein sehr schräger, der Oberfläche fast paralleler Schnitt (Vergr. 150—200). Fig. 7—10 senkrecht zur Oberfläche angefertigte Schnitte (Vergr. 900—1200 Imm.). Invasionsgänge mit Parasiten.

Fig. 11 a b c. Feine Gänge (Invasionsgänge) in der Epitheldecke neben der Mitte von syphilitischen primären Indurationen (Messter 2 Immers. $^1/_{12}$).

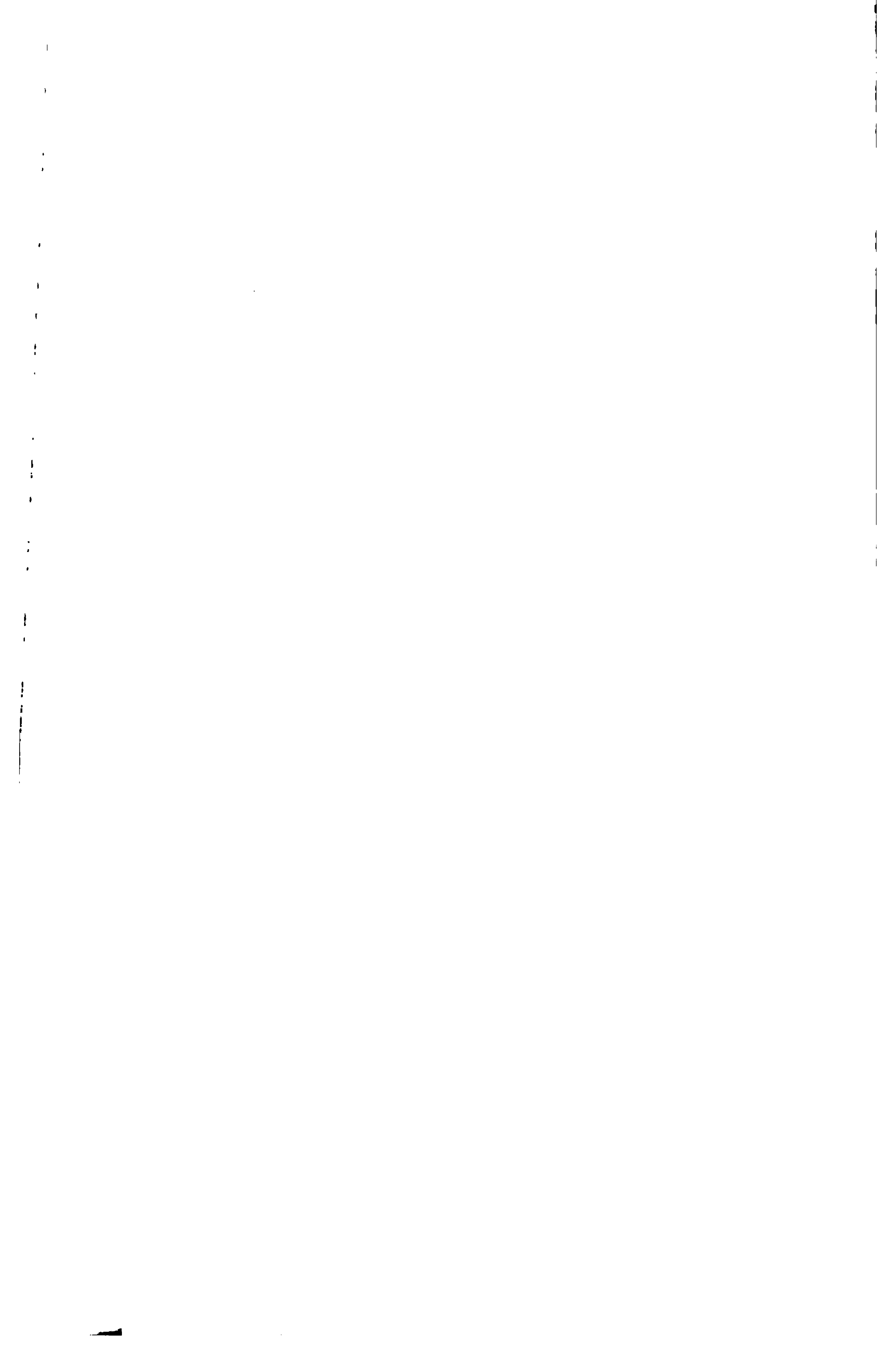


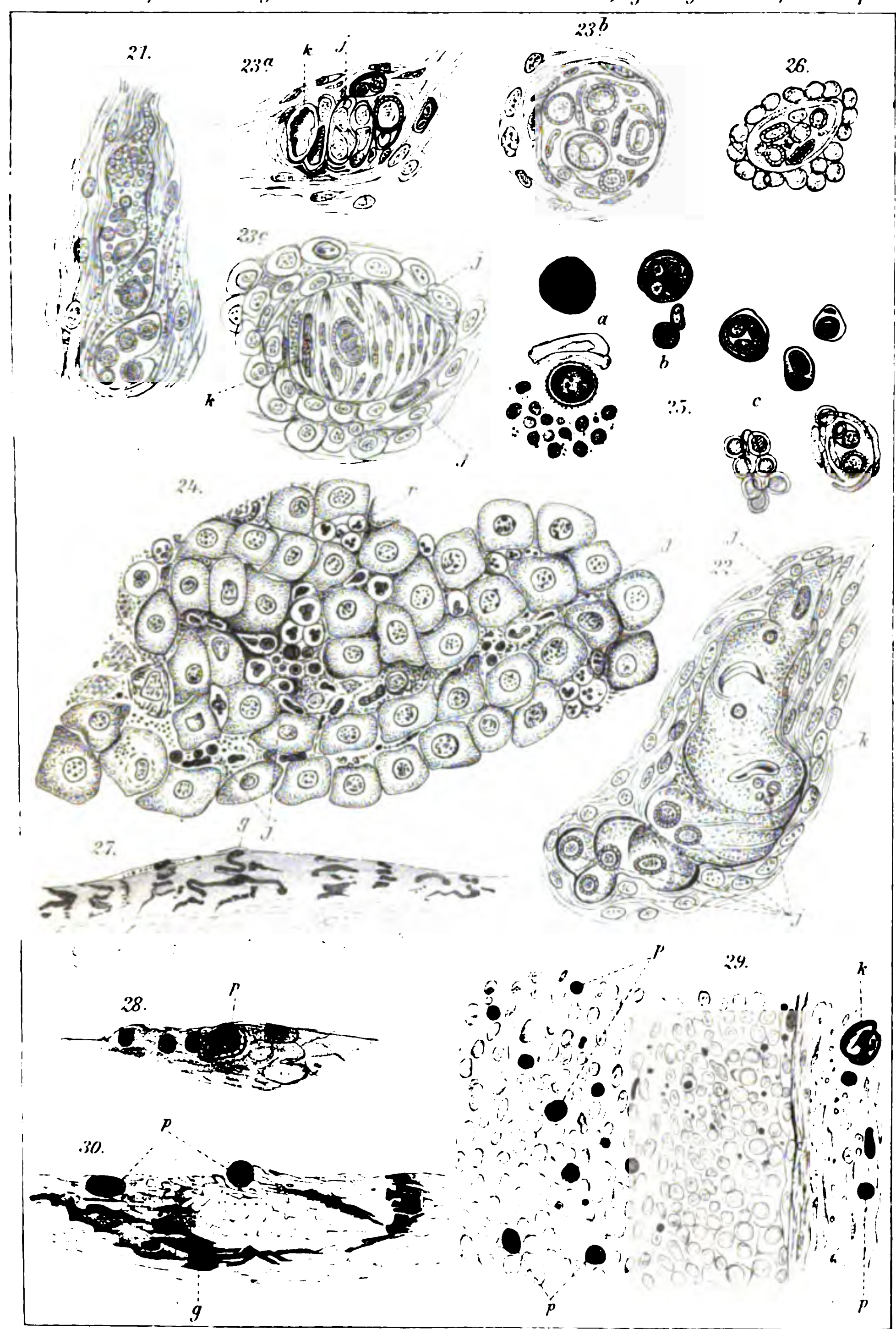
Gustav Fischer



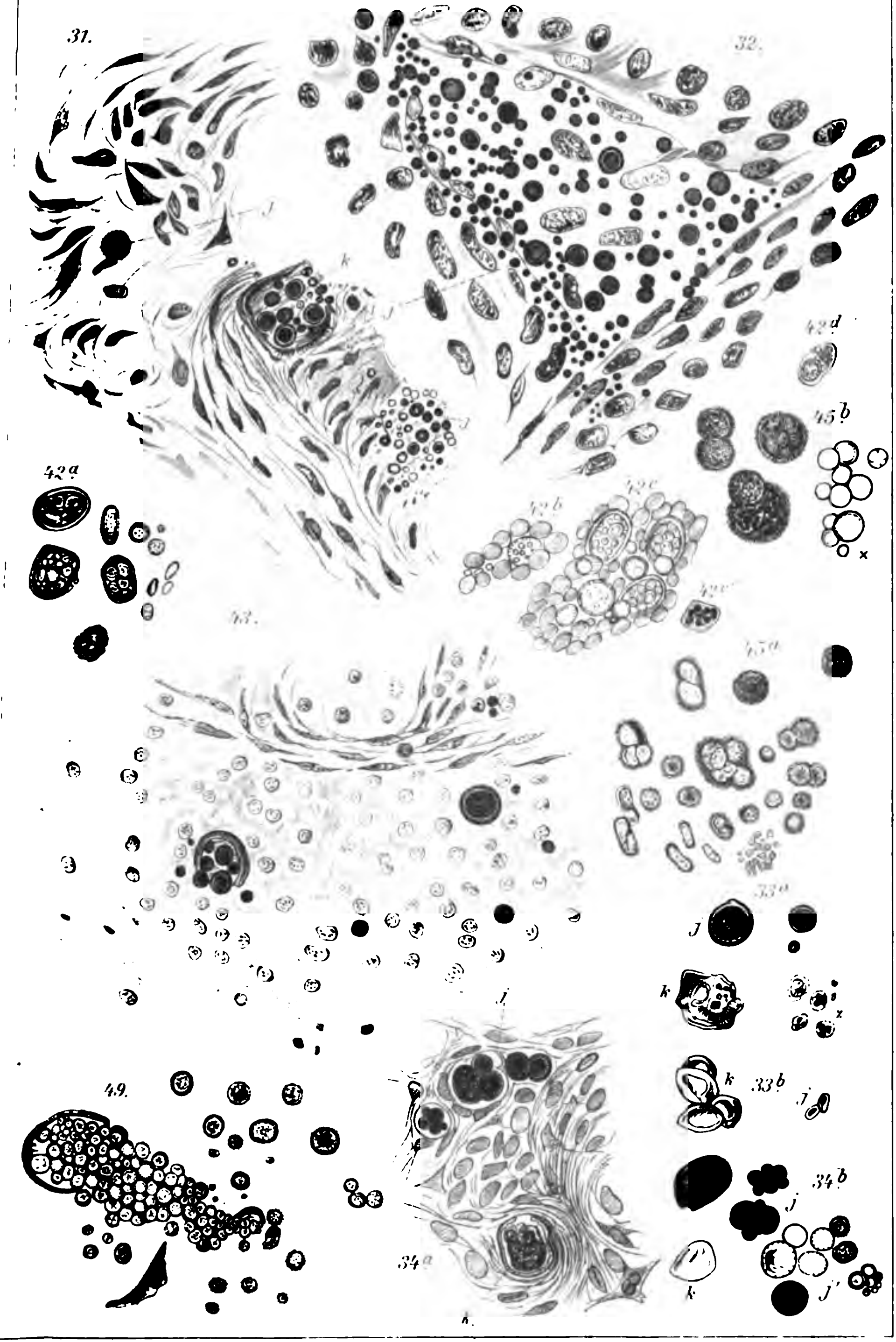


Verlag von Gustav Fischer Jena



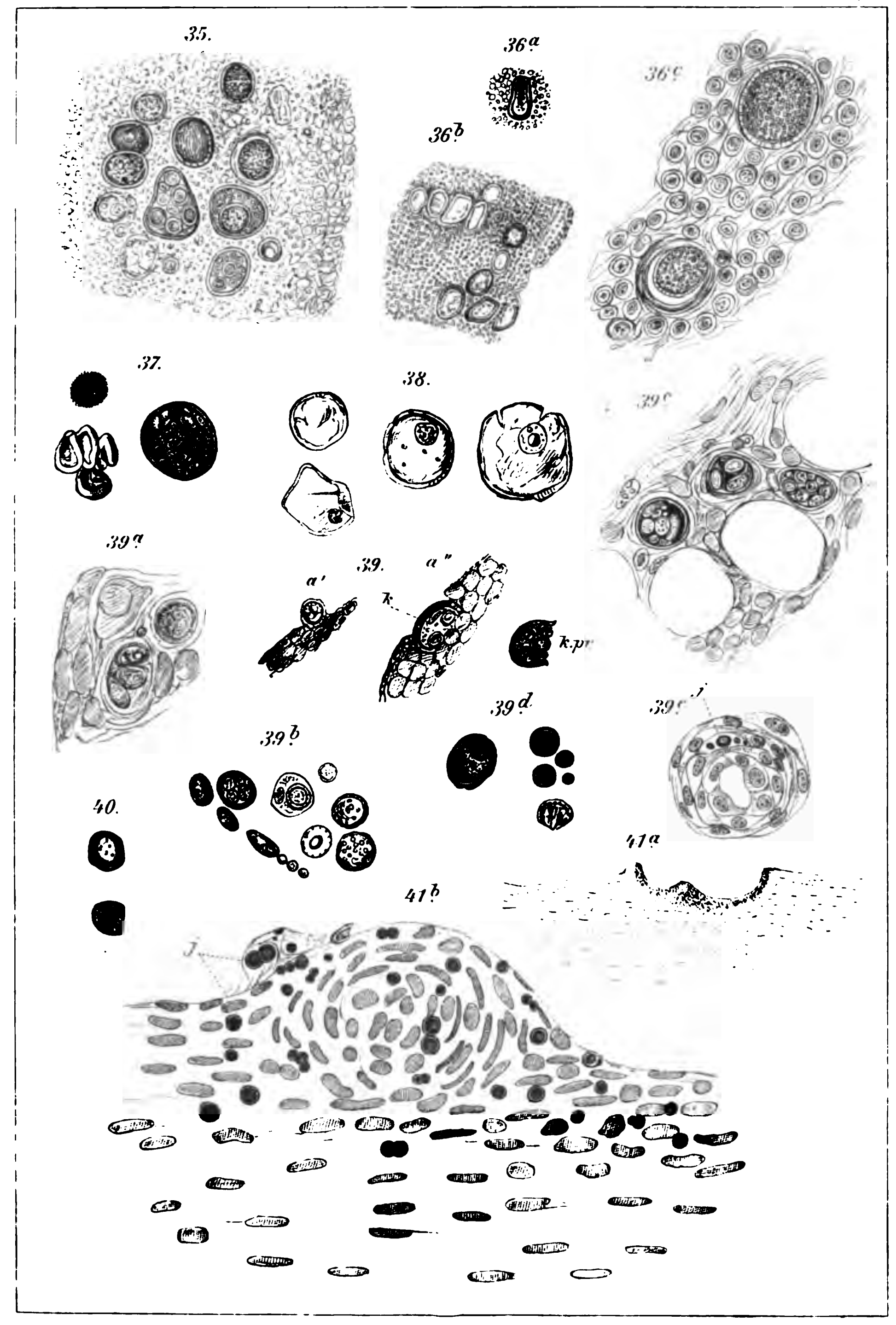


Verlag von Gustav Fischer in Jena.



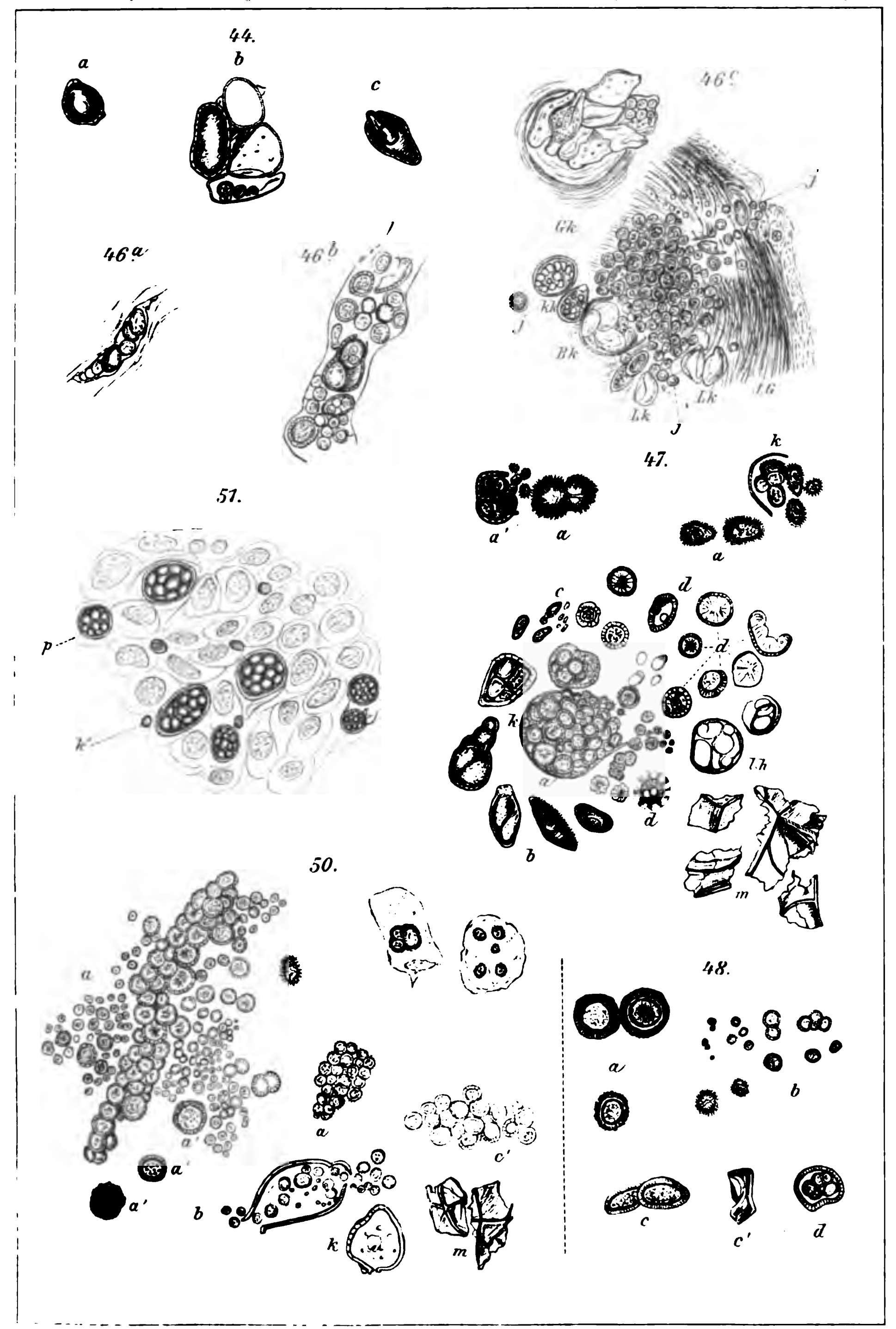
Gustav Fischer





Gustav Fischer





Verlag von Gustav Fischer Jena. Lith. Anst. v. F. A. Funke Leipzig



a) Feiner Gang zwischen den zum Teil körnig zerfallenen Epithelzellen der Epidermis. Karminfärbung, Xylolbalsam. b) Feiner analoger, direkt bis zur Außenfläche zu verfolgender Gang aus einer anderen Initialsklerose; ungefärbtes, mit Rhodankalium und verdünnter Salzsäure behandeltes, in Glycerin aufgehobenes Präparat unten querdurchschnittener erweiterter Gang mit jungen Organismen. c) Breiterer Gang mit Parasiten in dem Vorhautepithel von einer anderen syphilitischen primären Induration, ungefärbter, mit Amm. mur. behandelter Schnitt; außen geplatzte Kapseln, teils leer, teils mit jungen Organismen.

Fig. 12 a b. Querschnitte von dicht unter der Oberfläche liegenden erweiterten Invasionsgängen mit Brutkapseln und jungen Organismen in verschiedener Entwickelung. Aus mit Ammon. muriatic.-Lösung behandelten Schnitten einer primären Induration; bei b) die Parasiten im Schorfe; Parasiten hellgelblich. Messter 2 Immers. $^1/_{12}$.

Fig. 13 a b c. Große Kapseln aus primären Indurationen. a) aus einem zerfaserten, in Oel aufgehellten, b) aus einem in Citronenöl, c) aus einem in Xylol aufgehellten Schnitte. d) Körnchen- oder Sporenkapsel aus einem Schnitte eines Oberlippenschankers. Rhodankal.-Glycerin. Messter 2 resp. 4 Immers. $^1/_{12}$.

Fig. 14. Aus einem in Lavendelöl aufgehellten Zerzupfungspräparate einer vorher in Alkohol aufgehobenen syphilitischen primären Induration. a kleine runde Kapselhüllen. b c d Hüllen junger Organismen als doppeltkonturierte ovale braune Bläschen in den Saftgängen und Lymphgefäßkanälen. a Vergr. 500. b c d 900—1200.

Fig. 15—18. Aus einem syphilitischen Oberlippenschanker. Fig. 15. Feiner, nach unten buchtig erweiterter Invasionsgang leer, aus einem in Oel aufgehellten ungefärbten Mikrotomschnitte. *aa* freier Rand des Schorfes, in demselben feines Gangwerk durch die punktierten Linien angedeutet. *g* erweiterter Gang innerhalb des filtrierten Muskel- und Bindegewebes. Vergr. 120. b) Letzterer bei Vergrößerung 900.

Fig. 16. Aus der verschorften Mittelpartie des Oberlippenschankers. Hämatoxylin-Eosinfärbung, Xyloleinbettung. Buchtig erweiterter Invasionsgang mit Parasiten in verschiedenen Entwickelungsstadien. Zellen des Schorfes undeutlich in faserig körniger Masse, Kerne erkennbar. Messter 2. Immers. $^1/_{12}$.

Fig. 17. Aus dem Schorf derselben Initialsklerose der Oberlippe. Mit Indigokarmin gefärbtes Präparat. Sehr zarte, aber sehr klare Zeichnung. Große und kleine junge Organismen in Räumen des Schorfes. Messter 2. Immers. $^1/_{12}$.

Fig. 18. Aus dem indurierten Fett- und Bindegewebe desselben Oberlippenschankers. Nach einem ungefärbten, mit Ammonium muriat.-Lösung behandelten Schnitte; Reihen und Herde von jungen Organismen in verschiedener Entwickelung. Messter 2. u. 4. Immers. $^1/_{12}$. Diese gleichen Bilder gewähren mit Indigokarmin oder anders gefärbte Präparate, sowie mit Rhodankalium behandelte Schnitte.

Fig. 19. Aus dem indurierten Bindegewebe einer syphilitischen Initialsklerse der Vorhaut. Schwache Karmin-Jodjodkalifärbung; Parasiten hellgoldgelb mit Doppelformen junger Organismen in der Umgebung eines Blutgefäßquerschnittes. Zellkerne blaßrot. Messter 2. Immers. $^1/_{12}$ (Tageslicht).

Fig. 20. Aus dem tieferen indurierten Bindegewebe verschiedener syphilitischer Initialsklerosen, sämtlich nach Celloidinschnitten. Messter 2. Immers. $^1/_{12}$. *ab* nach Hämosiderinreaktion. *Bk* Brutkapsel mit grünblauen Partikeln in Körnern und jungen Organismen; *k* eine aus dem Gewebe fallende Kapsel, stark grünblau. *jj* junge Organismen; *c* aus dem Mikrotomschnitt einer kleinen während des Lebens oberflächlich mit heißer Luft behandelten syphilitischen Vorhautsklerose; ungefärbtes Präparat, aufgehellt mit Ammonium mur.-Lösung. Die größeren jungen Organismen und runden Kapseln *p* sind noch zu erkennen, wenn auch zum Teil in der Form verändert; andere junge Organismen sind glasig gequollen mit undeutlicher Struktur; *d* nach einem mit Thionin-Salzsäurespiritus gefärbten Präparate, junge Organismen in Doppelformen blaurot mit schmutzigvioletten Kernen, Gewebszellen bläulich.

Fig. 21. Aus dem indurierten Bindewebe eines syphilitischen Vorhautschankers, mit Hopfenöl aufgehellter Mikrotomschnitt. Gänge oder Spalträume mit jungen Organismen in verschiedenen Entwickelungsstadien, glänzend von citronengelber Farbe und klarer Struktur, Gewebe grauweiß. Messter 2. Immers. $^1/_{12}$.

Fig. 22. Desgleichen aus einer anderen syphilitischen Initialsklerose. Mit Buchten versehener Raum im indurierten Bindegewebe (vielleicht zum Teil entstanden durch Gewebszerfall). Innerhalb desselben eine feinkörnige Masse mit vereinzelten verschieden großen jungen Organismen und zwei großen Kapseln, jene deutlich kenntlich durch Form, Bau und Farbe, diese durch die Farbe. Einfache Aufhellung mit Citronenöl. Messter 2. Immers. $^1/_{12}$.

Fig. 23 a b c. Aus den tiefen Bindegewebsschichten syphilitischer Initialsklerosen. Zur Aufklärung der eigentümlich geschichteten und geformten Knoten narbigen Bindegewebes: dichte Einschließung von Parasiten (großen Kapseln und jungen Organismen) in narbigem Bindegewebe. (Vielleicht auf dem Querschnitt getroffene narbig verwachsene Parasitenräume.) a) das Vorstadium, Herde von großen Kapseln und jungen Organismen im Bindegewebe; b) Wucherung der Bindegewebszellen, beginnende Einschnürung und Einkapselung; c) späteres Stadium, fast ausschießlich geschichtetes Narbengewebe, aber mit noch einer gut erhaltenen und mehreren gefalteten Kapseln. Teils nach mit Thionin, teils nach mit Hämatoxylin gefärbten wie nach ungefärbten Präparaten. Messter 2. Immersion $^1/_{12}$.

Fig. 24. Außenrand der zerfallenen Epidermis neben einem vier Monate alten syphilitischen Schankergeschwür. Mikrotomschnitt. Zwischen den Epithelien viele Rundzellen oder Eiterzellen r. mit meist dreigeteilten Kernen, außerdem runde kuglige junge Organismen neben länglichen mit spitzrundem oder länglich ovalem Kern, in einer vielleicht aus Zellzerfall entstandenen körnigen Masse, in der auch noch Kokken und vereinzelte Bacillen zu bemerken sind. Hämatoxylinalaun, Xylolbalsam. Messter 2. Immers. $^1/_{12}$.

Fig. 25. Aus einer primären syphilitisch infizierten Lymphdrüse. a) aus Kapselhüllen ausgefallenes Protoplasma; Pianesefärbung. b) desgleichen mit jungen Organismen. c) junge Organismen verschiedener Größe in Zellen und in Gängen, Hämatoxylin-Eosinfärbung. Messter 2. Immers. $^1/_{12}$.

Fig. 26. Aus primär syphilitisch infizierter Lymphdrüse. Ovaler Raum mit doppelt konturierter Wandung, im Innern junge Organismen. Hämatoxylinalaun. Messter 2. Immers. $^1/_{12}$ (900).

Fig. 27. Schrägschnitt durch die Mitte einer syphilitischen Initialsklerose der Vorhaut; Alkoholhärtung, Celloidin, Entwässerung mit Alkohol, Aufhellung mit Lavendelöl, Xylol, Xylolbalsam. *g* Gänge mit Parasiten. Vergr. 120.

Figg. 28, 29. Ungefärbte aufgehellte Partieen des Randsaumes verschiedener Initialsklerosen der Vorhaut. *P* Parasiten. *k* leere große Kapseln. Messter 2. Immers. $^1/_{12}$.

Fig. 30. Desgleichen von der verschorften Partie einer syphilitischen Initialsklerose der Oberlippe. *P* Parasiten. *g* durchschimmernder Gang. Messter 2. Immers. $^1/_{12}$.

Fig. 31, 32. Aus mit Alaun-Hämatoxylin gefärbten Querschnitten eines vier Monate nach der Infektion exstirpierten, primären syphilitischen indurierten Geschwüres. Aus dem Gewebe unter der Ulceration; in Fig. 31 *k* eine geplatzte Kapsel mit verschieden großen jungen Organismen, daneben *j* eine Anhäufung solcher sehr kleiner ohne Kapsel; ein anderer größerer im Gewebe. In Fig. 32 eine große Menge freier verschieden großer und kleiner, meist kugelrunder, doppelt konturierter junger Organismen im Bindegewebe, nicht weit vom freien Rande des Schankergeschwüres. Die jungen Organismen sind dunkelblau gefärbt, meist mit deutlichem Unterschiede von Inhalt und Hülle. Kerne des Gewebes viel heller gefärbt. Messter 4. Immers. $^1/_{12}$ (1200) — Ursprünglich farbig gemalt.

Fig. 33. Von tertiär Syphilitischen. a) aus einem Strichpräparat eines zerfallenen Gummiknotens der Fußsohle; getrocknet, und mit Karbolfuchsin gefärbt. *k* leere Kapsel. *j* junge Organismen verschiedener Größe (besonders der größere von typischer Form). *z* Rundzellen, viel blässer gefärbt, während die Parasiten sehr intensiv gefärbt sind. b) aus einem anderen Gummiknoten nach einem ungefärbten Präparate. *k.* leere große Kapseln; braungelblich; *j.* etwas heller gefärbte leere Hüllen junger Organismen. Messter 2. Immers. $^1/_{12}$.

Fig. 34. Aus Schnittpräparaten von Schüller's Synovitis chronica villosa des Kniegelenks verschiedener Patienten. a) Fall H., vorher Gelenksyphilis. Mikrotomschnitt einer Zotte. Fuchsinfärbung. Mitten im Gewebe eine intensiv gefärbte geplatzte große Kapsel *k.* mit körnigem Inhalt, außerdem zahlreiche, meist kreisrunde, verschieden große intensiv gefärbte Kugeln, an einigen mit der noch deutlich erkennbaren Struktur der jungen Organismen. (Die „hantelförmigen Bacillen" sind nicht gezeichnet.) b) aus einem analogen Falle *K.* mit enorm zahlreichen jungen Organismen *j*, sowie einzelnen großen Kapseln mit und ohne Protoplasma. Fuchsinfärbung. c) aus einem ungefärbten Schnitte eines analogen Falles nach früher überstandener Gelenksyphilis *j.* blasse gequollene abgestorbene junge Organismen mitten im narbig geschrumpften Gewebe. Zeiss 4 DD.

Fig. 35, 36, 37. Aus gummösen Granulationen hereditär syphilitischer Kinder. Messter 2. Immers. $^1/_{12}$. Fig. 35. Aus der Daumenphalanx (Spina ventosa) eines 8-monatlichen Kindes. Grenzstelle der käsig eitrig zerfallenen Partie mit eingebetteten großen Kapseln (etwas zu dunkel gezeichnet) in verschiedenen Entwickelungsstadien und zum Teil abgestorbene junge Organismen; ungefärbter einfach

aufgehellter Schnitt. Fig. 36 a, b, c. Mikrotomschnitte eines zerfallenen subkutanen Bindegewebsknoten bei einem 2-jährigen Knaben mit zahlreichen gummösen Herden an verschiedenen Körperstellen; große Kapseln in verschiedenen Entwickelungsstadien (bei c. Körnchenkapseln) in verschiedener Vergrösserung. Fig. 37. Aus dem zerfallenen Gummiknoten des Stirnbeins bei einem 10-monatlichen Knaben, mit zahlreichen anderen Herden; leere Kapseln, Brutkapsel, ein borstenbesetzter junger Organismus. Aehnliche in vielen anderen Präparaten desselben Kindes. (Ausgeheilt nach 2 Jahren.) Die Farbe meist bräunlichgelb, bei den borstenbesetzten jungen mehr dunkelbräunlich.

Fig. 38. Aus dem Blutpräparate einer frisch incidierten syphilitischen Osteomyelitis eines hereditärsyphilitischen Kindes, große Kapseln; Messter 2 (4) Imm. $^1/_{12}$.

Fig. 39. Aus verschiedenen Mikrotomschnitten der Synovialis bei Synovitis syphilitica genu hereditaria bei einem 8-jährigen Kinde mit hereditärer Syphilis, nach einfacher Aufhellung mit Ammon. muriaticum oder mit Rhodankaliumbehandlung, aber auch in den gefärbten Präparaten ebenso; a a' a'' oberste nach dem Gelenkraum gerichtete Randpartie der Synovialis; b) mehr aus der Mitte, c) aus den tiefen resp. peripheren Schichten mit Parasiten, großen Kapseln und jungen Organismen in verschiedener Entwickelung. e) Gefäßdurchschnitt mit jungen Organismen *j* in der Wandung nach einem gefärbten Schnitte. Zeiss 4 DD. d) aus der Punktionsflüssigkeit eines syphilitischen Kniegelenks eines 4-jährigen Knaben mit hereditärer Syphilis, gefärbtes Deckglastrockenpräparat; junge Organismen. Messter 2. Immers. $^1/_{12}$.

Fig. 40. Junge Organismen aus einem frischen Zerzupfungspräparate eines hereditär syphilitisch erkrankten Handgelenkes bei einem Kinde. Messter 2. Immers. $^1/_{12}$.

Fig. 41. Hereditäre Gelenksyphilis. „Knorpelulceration". Schnitt durch den Gelenkknorpel, senkrecht zur Innenfläche. Hämatoxylinalaun. a) Vergrößerung 80. b) Vergr. 900 *j*. junge Organismen gefärbt, meist mit erkennbarem doppelt konturiertem Randsaum.

Fig. 42 und 43. Aus Mikrotomschnitten hereditär syphilitischer Halslymphdrüsen. Fig. 42a) nach Behandlung mit Rhodankalium und Salzsäure Glycerin. b) nach Ammon. muriat., Parasiten junge Organismen in Kapseln, sowie Körnchenkapseln im Gewebe. c) aus einem Präparate mit Hämosiderinreaktion, Kapseln und junge Organismen mit blaugrünlichem oder hellblauen Farbenton; außerdem blasse gequollene (abgestorbene) junge Organismen; d) eine Zelle mit eingeschlossenem jungen Organismus. Zeiss 3 DD. Fig. 43 Grenzstelle einer verkästen Partie nach Färbung mit Hämatoxylinalaun. In der Mitte geplatzte Kapel, daneben junge blaugefärbte Organismen von verschiedener Größe mit meist gut erkennbarer Struktur. Messter 2. Immers. $^1/_{12}$ (nach dem farbigen Bilde).

Fig. 44. Aus Kulturen verschiedener syphilitischer primärer Indurationen a) und c) der Vorhaut. b) des Labium. Große Kapseln, in c) ein Kerngebilde, bei b) in einer mehrere junge Organismen. Messter 2. Immers. $^1/_{12}$.

Fig. 45. Syphiliskulturen aus Vorhaut-Initialsklerosen. a) aus einer 14 Tage alten Kultur; Trockenpräparat, in Kanadabalsam eingeschlossen. Junge Organismen in verschiedenen Entwickelungformen; Farbe schmutzig-grüngelb bis gelbbräunlich. Messter 2. Immers. $^1/_{12}$. b) aus einer 5 Tage alten lebend im hängenden Tropfen auf dem erwärmten Objekttisch beobachteten Kultur. Junge Organismen, große borstenbesetzte Formen von dunkelgrünlichbrauner Farbe; daneben gequollene junge Organismen, Degenerations- resp. Absterbeformen. Messter (2) 4. Immers. $^1/_{12}$.

Fig. 46. Aus den Mikrotomschnitten einiger zur Kultur verwendeten syphilitischen Initialsklerosen des Labium min. et maj. a, b) Teile von Gewebsspalten und Gängen, gefüllt mit vielfach abgstorbenene Parasiten in verschiedenen Entwickelungsstadien, meist junge Organismen, einzelne große Kapseln. c) Mündungsgebiet eines Invasionsganges *IG*. *Lk* leere Kapseln. *Kk* Körnchenkapseln. *Bk* Brutkapseln, *j* junge Organismen (dazwischen vereinzelte Zellen, Zellkerne im Gewebe meist nicht mehr zu erkennen). *Gk*. Nest oder Querschnitt eines Ganges mit großen Kapseln. Messter 2. Immers. $^1/_{12}$.

Fig. 47. Syphyliskultur aus einer primär syphilitischen Drüse der Kinngegend. Messter 2. Immers. $^1/_{12}$. a) borstenbesetzte junge Organismen aus dem früheren Stadien der Kultur, b, c, d) aus späterer Zeit (4—6 Wochen bis mehrere Monate). a') gesprengte Brustkapseln. b) längliche, birn- und spindelförmige Brutkapseln. c) blasse junge Organismen von ovaler Form und grüngelbliche glänzende Körperchen („Körner, Sporen" ?). d) verschiedene Degenerations- und Absterbeformen junger Organismen, *lh* leere Hüllen; *m* fahlgraue bräunliche Reste des Maschenwerkes.

Fig. 48, 49, 50. Aus Kulturen von hereditär syphilitischen Halslymphdrüsen. Fig. 48. 6 Tage alt. a) größere junge Organismen bei verschiedener Einstellung, b) kleinste runde Formen; c) ovale junge Organismen; c') leere Kapsel,

d) großer junger Organismus resp. kleine Brutkapsel mit kleinen jungen Organismen. Messter 2. Immers. 900. Fig. 49. Vier Wochen alt. Geplatzte Brutkapseln. Fig. 50. Drei Monate alte Kultur (nach verschiedenen Präparaten). a) runde junge Organismen, in zusammenhängenden Haufen a' a') bei verschiedener Einstellung. b) geplatzte Brutkapsel und leere große Kapsel, c') mit 5-proz. Kalilauge behandelte junge Organismen; *m* Maschenwerkreste. Messter 2. Immers. $^{1}/_{12}$.

Fig. 51. Aus dem Mikrotomschnitte eines harten Schankers des inneren Vorhautblattes, seit 6 Wochen bestehend. Indigokarminfärbung. *p* Große, junge Organismen mit kleinen, rundlichen und ovalen Körnern (Sporen), dunkelblau; *k* einzelne freie „Körner" und kleine, junge Organismen, ebenfalls dunkelblau, zwischen den hellblauen Zellen des Bindegewebes. Messter 4. Immers. $^{1}/_{12}$. Gleichschöne Bilder mit den im Text erwähnten Doppelfärbungen mit Indigokarmin.

Zur Kenntnis der Myxosporidien.

Von Dr. **Ludwig Cohn,**
Assistent am zoologischen Institute in Greifswald.

Mit 3 Figuren.

In der Gallenblase eines Bressen aus dem Mauersee (Masuren) fand ich in ungeheurer Anzahl ein Myxosporid, das zu den *Sphaerospora* gehört. Die bisher bekannten Arten dieses Genus leben alle in den Nierengängen; daß sich das Genus nun auch in der Gallenblase findet, kann nicht wunder nehmen, da die Gallenblase der Fische eine sehr große Zahl der Myxosporidiengenera beherbergt (so kommen darin vor: *Ceratomyxa*, *Chloromyxa*, *Sphaeromyxa*, dazu kommt jetzt noch *Sphaerospora*). Die Galle war klar, die Gallenblase nicht merklich vergrößert, das Epithel zeigte das normale Aussehen.

Die *Sphaerospora masovica*, wie ich sie nach dem Fundorte nenne, besteht aus überaus kleinen plasmatischen Massen; ausgewachsene Plasmakörper, die schon ganz mit Sporen angefüllt sind, haben im äußersten Falle (an etwa kugelig zusammengezogenen Exemplaren gemessen) 0,038 mm im Durchmesser. Meistens bewegen sich die Maße zwischen 0,018 und 0,029 mm. In der Bewegung begriffen, sind es flache, durchsichtige, farblose Plasmamassen, bei denen das stark granulierte, zum Teil gelbliche Einschlüsse enthaltende Entoplasma den größten Teil ausmacht; das hyaline Ektoplasma ist meist nur ein schmaler Saum, doch kann es sich gelegentlich zu breiten lobosen Pseudopodien ausdehnen, welche das Entoplasma dann an Fläche übertreffen. Da eine solche Menge Ektoplasma meist gar nicht zu konstatieren ist, so ist es klar, daß hier bei der Bewegung ein Massenaustausch zwischen Ekto- und Entoplasma stattfindet; beide können eben ineinander übergehen. Die Bewegungen des Myxosporids sind so schnell, wie ich sie nur bei wenigen Myxosporidien gesehen habe.

Fig. 1a—g geben eine Folge der verschiedenen Bewegungsstadien eines Individuums innerhalb 10 Minuten wieder; zwischen den Formen h, i und k liegen sogar nur je 10 Sekunden. Es treten dabei Pseudopodien zweierlei Art auf, meist lobose, doch auch gut ausgeprägte spitze Fortsätze; zwischen beiden sind Uebergangsformen vorhanden, wie Fig. 2a—e zeigen. Die spitzen Pseudopodien scheinen etwas festere Konsistenz zu haben, denn sie bilden sich ebenso langsam aus, wie sie wieder verschwinden. Oft bildet sich nur eine solche Spitze aus, die dann den übrigen Plasmakörper bis zum Doppelten an Länge über-

treffen kann, meist sind es aber zahlreichere kleine Spitzen, so daß gelegentlich das ganze Tier wie gestachelt aussieht. In den lobosen Pseudopodien sieht man das Entoplasma (Eosinfärbung intra vitam) in feinen Fäden sich in das die Hauptmasse bildende Ektoplasma hinein fortsetzen, wie ich es auch für *Myxidium Lieberkühnii* beschrieben habe.

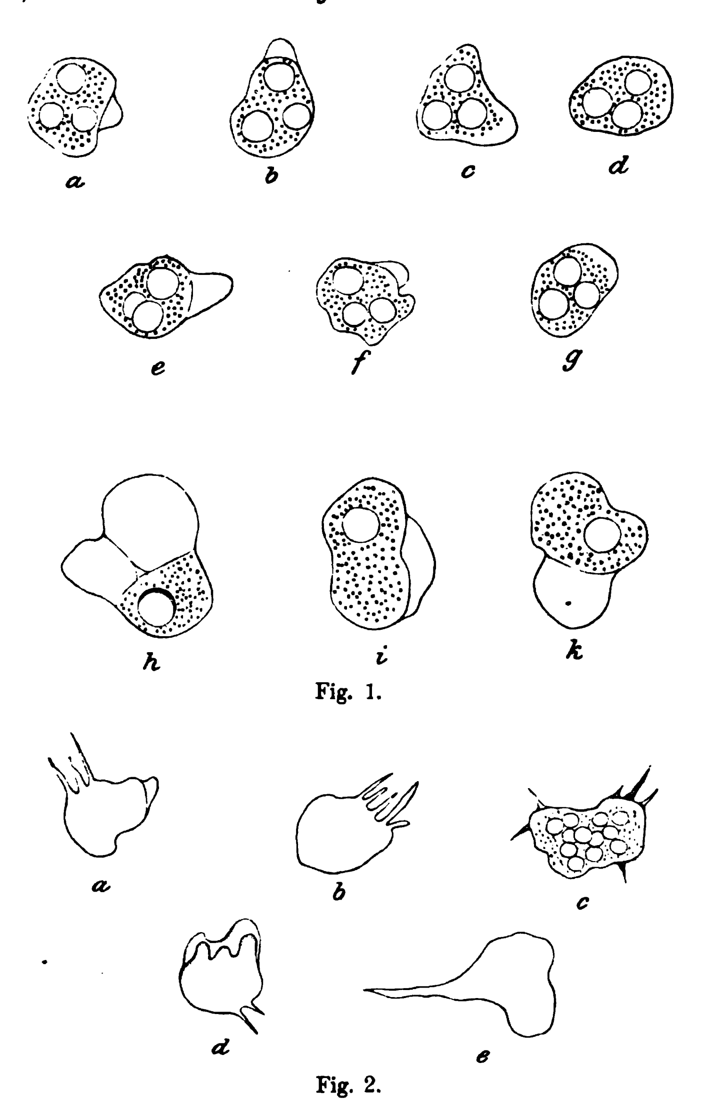


Fig. 1.

Fig. 2.

Ich fand die Myxosporidien in allen Größen. Die kleinsten hatten nur eine solche von 0,01 mm und enthielten noch keine Sporen, — die ersten Sporoblasten traten in Exemplaren von 0,018 mm auf, die je einen enthielten. Mittelgroße von 0,029 mm wiesen bis über 4 auf, während die Höchstzahl der in einem 0,038 mm großen Individuum gezählten 22 betrug; hier war vom Plasma nur noch ein schmaler Saum erhalten. Bei den lebhaften Bewegungen des Tieres fließen nicht

nur die Einschlußkörner umher, sondern auch die Sporoblasten geraten manchmal beim stürmischen Vorgehen eines lobosen Pseudopodes in Bewegung in der Richtung des letzteren. Die sporenlosen und die erst wenige Sporoblasten aufweisenden Individuen haben häufiger lobose Pseudopodien, während die stark mit Fortpflanzungskörpern belasteten weniger beweglich waren und mehr spitze Fortsätze zeigten.

Die Sporen sind in den Sporoblasten zu je zweien enthalten. Sie sind kugelrund und haben 0,008 mm im Durchmesser. Die Leiste an der Verbindungsstelle beider Schalenhälften tritt stark vor und verläuft längs, d. h. so, daß sie die beiden Polkörper in der Seitenansicht voneinander trennt. Diese sowie das Sporoplasma sind relativ klein und füllen den Innenraum der Spore nur etwa halb aus (Fig. 3). Die Polkörper konvergieren nach vorne. Durch Anwendung der einfachsten Mittel, durch Erwärmung, konnte ich die Polfäden bis zu 0,038 mm Länge ausschnellen machen, und auch die starren Fäden, welche ich bereits (1) beschrieben habe, traten hervor; diese 0,014 mm langen Filamente werden wohl von der Verschlußleiste abgelöst werden (beim Oeffnen der Spore); daß sie mit den Polfäden zugleich sichtbar werden, bestätigt, daß das Hervorschnellen der Polfäden ein mit dem Austreten des Sporeninhaltes eng verbundener Vorgang ist.

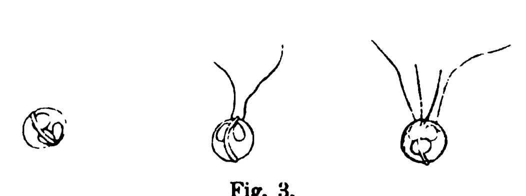


Fig. 3.

Die überaus große Zahl von Individuen aller Größen bis zum kleinsten hinab, welche in der Gallenblase enthalten war, weist darauf hin, daß hier eine dauernde Autoinfektion stattfindet, und zwar eine Vermehrung durch Teilung der Plasmakörper, wie sie für Sporozoen schon vielfach beobachtet worden ist. Ein Ausschlüpfen der Sporen innerhalb der Gallenblase ist ausgeschlossen, da ich nie leere Sporenhüllen, nie sogar vorgestülpte Polfäden fand. Dagegen fand ich im Darminhalte des Bressen mehrere Sporen, noch ganz unverändert, aber frei und einzeln. Da ich sie in der Gallenblase nie einzeln fand, so müssen sie mitsamt den Plasmakörpern und Pansporoblasten in den Darm gelangen und erst dort, nach Zerstörung dieser, frei werden. Hier gelang mir auch eine Kernfärbung, durch welche ich 2 Kerne im Sporoplasma nachweisen konnte; eine Vakuole ist, der Diagnose der Familie *Myxidium* entsprechend, zu der das Genus *Sphaerospora* gehört, nicht vorhanden.

Ich erwähnte soeben, daß die endogene Vermehrung der *Sphaerospora masovica* aller Wahrscheinlichkeit nach durch Teilung der jungen Individuen vor sich geht. Bei dieser Gelegenheit möchte ich auf die letzte Arbeit von Mesnil eingehen, der solche Teilung jüngster Individuen auch bei *Myxidium Lieberkühnii* konstatierte (2). Er wendet sich aber dabei gegen meine einstigen Ausführungen (1) über die bei *Myxidium* vorkommende Knospung und behauptet, die einfache Teilung sei die einzige Art der Vermehrung desselben innerhalb der Harnblase.

Wenn wir die beiden Arten der Vermehrung, binäre Teilung und Knospung, wie ich letztere bei *Myxidium* konstatierte, vergleichen, so finden wir keinen eigentlichen prinzipiellen Unterschied: im Grunde genommen war das, was ich als Knospung bezeichnete, doch nichts anderes, als

eine vielfache gleichzeitige Teilung, der Vorgang ist der einfachen Teilung eines Plasmakörpers nahe verwandt, wenn auch mit ihm nicht identisch.

Mesnil verneint nun auf Grund seiner mit Laveran zusammen ausgeführten Untersuchungen das Vorkommen einer solchen Knospung oder multiplen Teilung überhaupt bei *Myxidium*. Trotzdem halte ich meine Beobachtung aufrecht; der Gegenbeweis scheint mir nicht überzeugend zu sein. Ich hätte gern neues Material beigebracht und Nachuntersuchungen angestellt, doch kommt leider hier in Greifswald das *Myxidium Lieberkühnii* nicht vor, und nur Untersuchung lebenden Materials kann da zum Resultate führen.

Das eben ist der springende Punkt bei Beurteilung der Angaben von Mesnil und Laveran. Sie haben, um die von mir beschriebenen Knospungsstadien aufzufinden, Präparate von Material, das mit Pikrinsäure oder Sublimat konserviert war, untersucht, nicht lebende Tiere. „Dans nos frottis, où certains parasits ont subi une très légère contraction au moment de la fixation“ u. s. w. heißt es — jeder, der Myxidien konserviert hat, weiß, daß die Kontraktion eine recht starke ist, was mit der Angabe „certains individus“ auch übereinstimmt. Dann aber können die Autoren dafür, daß sie keine Myxidien mit den mittels einer oder mehrerer sehr dünner Brücken anhaftenden Knospen gefunden haben, nur ihre Untersuchungsmethode verantwortlich machen; in konserviertem Material habe ich sie auch nie zu Gesicht bekommen.

Weiterhin suchen die Autoren zu erklären, wie ich zu der irrtümlichen Auffassung einer Knospung gekommen sein mochte. Sie geben in Fig. 2 eine gute Abbildung eines großen *Myxidium*, dem zahlreiche junge Individuen dicht anliegen. „Nous constatons que toujours la grosse Myxosporidie et les petites qui y sont accolées ont un bord ectoplasmique bien limité; quelquefois, les deux bords en regard sont frangés, et les dents de l'un engrènent avec celles de l'autre. Mais jamais il n'existe le moindre pont protoplasmique reliant les petites Myxosporidies à la grosse.“ Das Bild und die Beobachtung sind nicht neu; ich habe schon darauf seiner Zeit hingewiesen und selbst die Kontinuität der Begrenzung der großen und der anlagernden kleinen Individuen betont, als es mir darauf ankam, die Angabe Pfeiffer's (3) zu widerlegen, daß die Myxidien Plasmodien, also aus mehreren Individuen zusammengeflossene Einheiten seien. Ich unterschied solche Bilder sehr genau von den mit deutlichen Brücken an das Hauptindividuum gehängten Knospen, so daß ich nicht einverstanden bin, wenn die genannten Autoren annehmen: „peut-être Cohn s'est-il laissé induire en erreur par la présence de mucus.“ Ich glaube, daß meine Beobachtung der Knospenbildung, der Streckung der Brücken und der endlichen Zerreißung derselben beim Freiwerden der Knospe durch das Obige nicht widerlegt ist.

Nicht einverstanden bin ich mit der Angabe, daß alle großen Individuen an der Harnblasenwandung befestigt sind und niemals frei umherschwimmen. Der Irrtum der Autoren geht wieder auf dieselbe Ursache zurück, indem sie konserviertes Material auf Schnitten zur Feststellung dessen untersuchten, wie die Myxidien in der Blase enthalten sind. Da konnte es sehr wohl kommen, daß alle frei schwimmenden bei der Fixation und Härtung aus der Harnblase herausgeschwemmt worden sind und nur die festsitzenden sich im Schnitte zeigten. Man braucht nur eine stark infizierte Harnblase aufzuschneiden, so fließt mit dem Harne eine große Anzahl vollkommen

ausgewachsener Individuen heraus, wie sie größer auch nicht an der Wandung festsitzen. Daß dies der Fall sein muß, darauf weist auch der Umstand hin, daß bei weitem nicht alle großen Myxidien den Fuß, mit dem sie festsitzen, entwickelt zeigen, so daß es ausgeschlossen ist, daß sie beim Oeffnen der Harnblase etwa nur gewaltsam von der Wandung abgerissen wären.

Litteratur.

1) Cohn, L., Ueber die Myxosporidien von Esox lucius und Perca fluviatilis. (Zool. Jahrb. Abt. f. Anatomie. Bd. IX. 1896.)
2) Laveran, A. und Mesnil, F., Sur la multiplication endogène des Myxosporidies. (Compt. rend. d. séances d. l. soc. d. biol. Paris. 3. Mai 1902.)
3) Pfeiffer, L., Die Protozoen als Krankheitserreger. Jena 1891.

Heronimus chelydrae, nov. gen. nov. sp. A new monostome parasite of the American snapping-turtle.

By **W. G. MacCallum,**
Associate Professor of Pathology Johns Hopkins University, Baltimore, U. S. A.

With 2 figures.

In the lungs and larger bronchial tracts of a river snapping turtle (*Chelydra serpentina*) taken in the summer of 1897 in the Grand River at Dunnville, Ontario, Canada, there were found a number of trematode worms of a rather peculiar form. Since no description of such a worm is to be found in the literature the following brief note on its anatomy together with a proposal for its classification is offered.

The worm is not by any means a constant parasite in the lungs of this turtle, for a number of specimens have since been examined without finding any, although two species of nematodes, later to be determined, are practically constantly found in the alimentary tract. The trematode worms found in the lung measure about 15 mm in length by 2—3 mm in diameter. They are rounded and somewhat club-shaped, tapering toward the anterior end, the posterior end being bluntly rounded. They are rather opaque and whitish but a coiled dark brown structure is visible through the skin. There is a single terminal anterior sucker.

The worms are so thick and so delicate that comparatively little could be made out from study of the complete worm. The anatomy was therefore worked out mainly from serial sections.

The skin is quite thin and unarmed. It measures 10 μ or more in thickness and stains very palely with carmine. The extreme superficial layer is more refractive than the underlying part which is slightly granular. It is sometimes thrown up into small folds or rugae independent of the musculature. Underlying the cuticle directly are the usual three layers of muscle fibres, the outermost transverse the next longitudinal then oblique fibres running in both directions. Some strands dipping into the interior or crossing the body are probably of muscular nature.

The underlying parenchyma is quite loose in structure. The cells in the more central portions of the body are very large with a large nucleus lying in the centre. The protoplasm is quite clear except for

strands and lines which form a little accumulation about the nucleus and about the outlines of the cell, so that the tissue has the appearance of a loose network in the meshes of which lie nuclei. In other places this network seems to consist rather of stellate cells. Toward the surface of the body the cells are much more closely arranged and there are cells elongated in a direction perpendicular to the skin to which they send processes.

The alimentary tract begins in a rather weak and very small sucker at the anterior end. This has a cuticular lining and radiating musculature, the fibres of which are separated quite widely by very numerous somewhat ramifying cells. Circular muscle fibres, if present at all are very small and cannot be definitely traced. The sucker is in almost immediate communication with the muscular pharynx which exceeds it in size.

This pharynx is somewhat pear-shaped — it has a cuticular lining and is composed of internal and external circular muscle fibres as well as the radial ones. It opens by a very short trunk with cuticular lining into the branched intestine. In its central portion among the radial muscle fibres are numerous large cells with large nuclei provided with nucleoli. There is also an accumulation of elongated cells about the cuticular oesophagus or trunkfrom pharynx to the point of bifurcation of the intestine. The intestine is covered everywhere by a thin layer of flattened cells but there is no evidence of a muscular wall. The cuticular lining which extends to the point of bifurcation is suddenly exchanged for the intestinal mucosa which consists of a single layer of cubical cells from which arise in many places long processes of single cells which are somewhat ragged or feathery in appearance almost as if ciliated. Many of these contain at their end a small refractive droplet. The intestinal coeca contain a mass of partly disintegrated cells and granular debris among which mononuclear eosinophile cells can be recognized although the majority are the oval nucleated red corpuscles of the turtle's blood. The intestinal coeca remain simple, the oesophagus branching into two trunks which run transversely for a short distance when they turn backward reaching after a zigzag course the posterior extremity of the body. Here and there there are very short diverticula.

Generative apparatus: — There is a single rounded or ovoid ovary situated near the anterior extremity. It lies in the dorsal region on the left side and gives off an oviduct which runs in a curved direction upward and slightly backward; coming downward this receives a large sac like receptaculum seminis, after which it is joined by the duct of the yolk gland or vitellarium, a structure consisting of two simple tubular glands which reach about half-way to the posterior end of the body and unite anteriorly to form the duct just described. The oviduct then passes through a radially arranged mass of pear-shaped large cells which converge about it and represent, no doubt, a shell gland. There is no evidence of the presence of a Laurer's canal. The oviduct passes then directly into a widened portion which runs with many convolutions backward and constitutes the uterus. The canal between the shell gland and the uterus is quite short; that from the ovary to the shell gland is longer and coiled, and at its union with the receptaculum seminis is surrounded by a group of deeply staining cells.

The uterus is extensively convoluted and folded and runs about through the length of the body as a thin-walled tube containing eggs

in various stages with a more or less definite egg shell. Near the anterior extremity of the body this thin-walled tube becomes thicker walled, wider and deeply pigmented. The walls are lined by a high epithelium almost resembling that of the intestine. It here contains dark pigmented eggs and much granular pigment material. Coiling backward this narrows into a thick walled portion with stout musculature and high columnar epithelium. This with many elongated coils or spirals runs toward the posterior extremity of the body where it opens into a large wide and greatly elongated sac similarly lined with high epithelium and stretching throughout almost the whole length of the body. Anteriorly this communicates by means of a short tube with high epithelial lining and like the sac itself possessing a muscular wall, with a large cloaca or bursa copulatrix which in turn opens at the internal genital aperture lying just ventral to the anterior sucker. This orifice has a thick cuticular lining which is replaced in the cloaca by the lining layer of flattened cells. The cloaca which is provided with a special musculature, extends back behind the level of the pharynx and receives the canal from the uterus at its extreme posterior end. Ventrally at a point near its outlet it receives the somewhat convoluted tube of the male generative apparatus which runs ventrally to it from a thin walled elongated sac filled with spermatozoa. Spermatozoa are often found in the cloaca and even in the great uterine sac at its posterior end where it receives the narrower portion of the uterus.

The male generative apparatus as described above opens on the ventral side of the bursa near its opening by a tube about as long as the bursa. This tube has a thin wall and is covered by a single row of flat cells and lined with cuticle. It forms the continuation of a convoluted rather thick walled tube whose cellular lining seems to be furnished with cilia-like processes; this tube is coiled within another tube and surrounded directly by parenchyma like cells. At its posterior end it opens into a wide thinner walled sac still apparently without musculature. This sac which is very much elongated runs backward about one-third of the body length in many convolutions. At its posterior end it receives one vas deferens which is a rather thick walled tube of considerable diameter and lined with a single row of cubical cells. This arches over to open obliquely into the anterior division of the testis, a mass lying rather to the right and giving off a branch backward toward each side of the body. These branches widen out into elongated lobulated and convoluted structures. At some points the constriction is so great that the lobules are connected only by tubular canals. Nevertheless from the arrangement of the vas deferens we must no doubt consider it a single testis. In section it is seen that the thin covering wall of these sacs is lined by several rows of cells which then leave a wide lumen in which many other cells are scattered or arranged in groups, apparently in semifluid substance in which lie myriads of spermatozoa.

The nervous system has the usual arrangement. Large ganglia lie one on each side of the pharynx and connected with a commissure which runs dorsally. From the ganglia nerves run forward to the anterior end of the body and stout lateral trunks may be traced backward along the ventral margin.

On the dorsal surface at a point not far behind the posterior level of the pharynx is a small orifice with cuticular lining which is the opening of a large median dorsal sac which runs backward nearly to

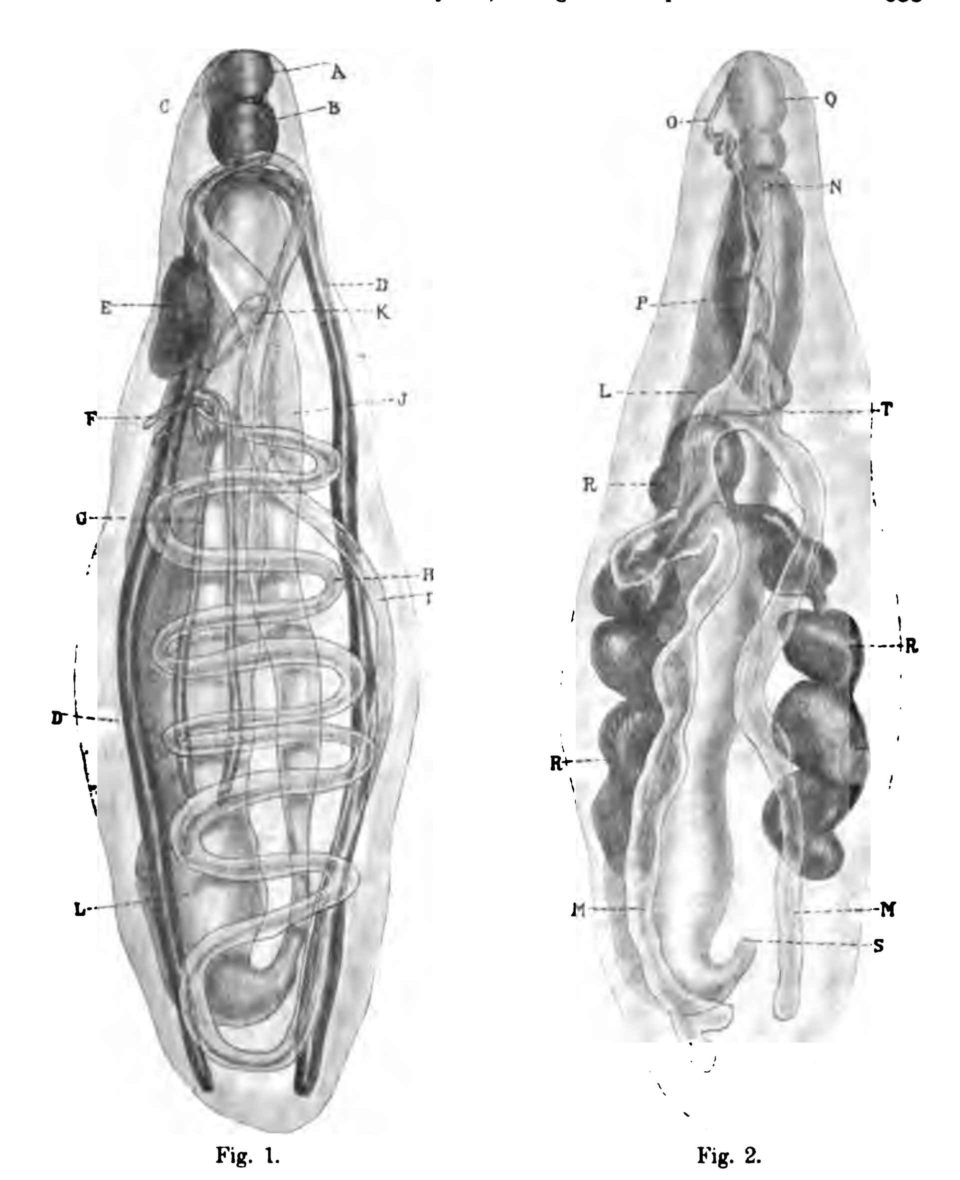


Fig. 1. Fig. 2.

On account of the complexity of structure it was found necessary to make two drawings of the worm in each of which part of the organs are depicted.

Fig. 1. View of *Heronimus chelydrae* from above. *A* mouth sucker. *B* pharynx. *C* cloaca or genital bursa. *D. D* intestinal coeca. *E* ovary. *F* shell gland. *G* yolk gland. *H* first division of uterus. *I* second division of uterus. *J* third or pigmented division of uterus. *L* fourth division of uterus forming a large uterine sac. This is shown better in Fig. 2 where the intestinal tract is not represented. *K* receptaculum seminis.

Fig. 2. Also a dorsal view shows the male genital apparatus and the excretory vesicle. *C* genital cloaca receiving, *O*, the prolongation of the cirrus sac. *R* large single testis joining *P* the cirrus sac by a single vas deferens (*T*). *M. M* excretory sac opening dorsally at *N*. *S* cut end of uterine sac after removal of uterine coils.

the posterior extremity of the body with numerous blind coeca given off from all sides. The main trunk bifurcates the branches running laterally toward the posterior end. This sac has a thin wall and is lined by a single layer of flattened cells. It apparently represents the excretory system of the worm.

From this description it is clear that the worm does not fall readily into any of the groups already established. It is obviously not related to the monogenetic trematodes with their complicated organs of attachment. Use was made of the classification given by Braun[1]) in the attempt to determine its position. Among the digenetic forms it is at once excluded from the *Aspidocotylea* by their possession of but a single intestine and a ventral organ of attachment. The possession of only one sucker leaves but a small group of the *Malacocotylea* into which it could possibly be placed. These Braun classifies into three groups one of which has a ventrally placed imperforate sucker, the *Gasterostomidae*, of the others which have an anterior sucker, pierced by the digestive tract, the *Didymozoonidae* are not to be considered because they are animals living in pairs in a capsule. The remaining group *Monostomidae* contains a considerable number of genera but careful examination of the descriptions of members of this family as found in the recent works of Brandes[2]), Looss[3]), Monticelli[4]) and Braun[5]) as well as those less satisfactory descriptions of Diesing, Leidy and many others fails to reveal anything comparable with this form and each worm could be eliminated from consideration with ease. Of the new genera recently described by Looss none could possibly be made to contain it although the genus *Haplorchis* perhaps approaches it in possessing but one testicle.

It seems necessary therefore to establish a new genus in the family *Monostomidae* to accommodate this form — a genus which stands far apart from the other genera in several respects, but especially in the position and nature of the genital opening, in the complicated structure and course of the uterine tract, the unusual formation of the yolk glands, in the presence of but one testicle and in the position of the excretory pore. The generic name *Heronimus* is therefore proposed, the type species on account of its habitat being named *Heronimus chelydrae*.

1) Braun, Bronn, Klassen und Ordnungen. IV. Vermes.

2) Brandes, Revision der Monostomiden. (Centralbl. f. Bakt. u. Paras. Bd. XII. 1892. p. 504.)

3) Looss, Weitere Beiträge zur Kenntnis der Trematodenfauna Aegyptens. (Zool. Jahrb.; Abt. f. Syst. Bd. XII. 1899. p. 521.)

4) Monticelli. Studii s. trem. endopar. Contrib. allo stud. d. Monost. (Mem. Accad. Torino. (2) T. LXII. 1892. p. 683.)

5) Braun, Die Trematoden der Chelonier. (Mitt. aus d. Zool. Museum zu Berlin. Bd. XI. 1901.)

Ueber befruchtete und unbefruchtete Ascarideneier im menschlichen Kote.

Von

Dr. K. Miura, und **Dr. N. Nishiuchi,**

Prof. der inn. Med. an der Kaiserl. Universität zu Tokio.

Assistenten der Klinik und Marinearzt.

Mit 1 Figur.

Einer von uns (M.) beobachtete im Jahre 1898 mit dem leider früh verstorbenen Dr. Yoshizawa im Kote eines an Neurasthenie und Kakke leidenden jungen Mannes Eier von länglichrunder Form, gelblicher Farbe und dünnen Schalen, deren Inhalt aus runden glänzenden Körnern bestand. Da wir innerhalb des betreffenden Kotes nur diese und keine sonstigen Eier fanden, so dachten wir damals an die Anwesenheit einer neuen Art von *Ascaris* im Darme des Kranken. Wir verordneten ihm eine Mischung von Thymol, Naphthalin und Santonin mit Abführmittel und bekamen ein *Ascaris*-Muttertier, in dessen Uterus wir wieder ganz gleiche Eier antrafen, nur mit dem Unterschiede, daß sie ungefärbt und mit reicherer Eiweißhülle bedeckt waren. Eine genauere Untersuchung der ausgetriebenen *Ascaris* in Bezug auf Morphologie ergab keinen Unterschied von der gewöhnlichen *Ascaris lumbricoides* und wir waren zunächst noch im unklaren über den Zusammenhang der betreffenden Eier mit der gewöhnlichen Form. Später, im Laufe dieses Jahres traf einer von uns (N.) im Kote verschiedener Kranken wiederholt ähnliche Gebilde, und die Sache blieb trotzdem unentschieden, bis der andere von uns (M.) bei der Eröffnung der gewöhnlichen *Ascaris* innerhalb des Uterus derselben diese fraglichen Eier mit den gewöhnlichen gemischt antraf. Hierdurch war der Zusammenhang der beiden Formen mehr oder weniger klargestellt; denn es könnte nämlich sein, daß die gewöhnlichen Ascarideneier, wie wir sie täglich sehen und wie sie in den meisten Lehrbüchern abgebildet werden, die befruchteten sind, während die von uns beobachteten die unbefruchteten Formen derselben darstellen. In der That hat die daraufhin gerichtete Untersuchung die Richtigkeit dieser Vermutung bestätigt, wie wir später sehen werden.

Bei der Durchsicht der uns zugänglichen Litteratur haben wir keine Angaben gefunden, daß man im menschlichen Kote befruchtete und unbefruchtete Ascarideneier vorfindet. In allen Beschreibungen werden nur jene rundlichen oder länglichrunden, mit dreifachen dicken Schalen und höckeriger Eiweißhülle bedeckten Eier von gelblicher Farbe beschrieben, welche offenbar die befruchteten sind. Der Inhalt dieser schon befruchteten Eier ist feingranuliert, seltener grobgranuliert, von runder Gestalt, so daß man an den beiden Polen zwischen dem Inhalt und der etwas länglichen Schale zwei sichelförmige Spalten mit wasserklarer Flüssigkeit antrifft. Im Inneren dieses kugligen Inhaltes ist auch meist der Kern als ein heller Fleck zu sehen; in anderen Fällen ist er jedoch auch nicht zu sehen. Nur die Abbildung von Schneider[1]), welche auch in das Lehrbuch von Küchenmeister und Zürn über-

1) Schneider, Monographie der Nematoden. Berlin 1866.

gegangen ist, hat einige Aehnlichkeit mit den unbefruchteten Ascarideneiern. Leuckart[1]) unterscheidet in seinem berühmten Werke zwar im Leibe der Ascariden befruchtete und unbefruchtete Eier, jedoch nicht im Kote.

Die von uns beobachteten unbefruchteten Eier haben meist länglichrunde oder ovale Gestalt und verjüngen sich nach beiden Enden zu, um stumpf zu enden. Manchmal ist die äußere Kontur derselben keine regelmäßige, sondern sie beschreibt eine leicht wellige Linie und die Eier zeigen dann mehr oder weniger deutliche Einschnürungen oder sie nähern sich den Eiern von *Oxyuris*, indem die Krümmung der Schale auf der einen Seite stärker ist als auf der anderen. Außerdem giebt es mehr längliche und mehr breite Eier, ferner solche, deren beide Enden abgestutzt aussehen. Diese Formverschiedenheiten werden bedingt teils durch die geringere Widerstandsfähigkeit der Schale, teils durch ungleichmäßige Verteilung der Eiweißhülle u. dergl. Die doppelt konturierte Schale ist hier verhältnismäßig dünn und zeigt eine stärker lichtbrechende innere und eine weniger deutliche äußere Begrenzungslinie, während die Schalen der befruchteten Eier viel dicker sind und gewöhnlich drei deutliche Linien zeigen. Die Eiweißhülle der ersteren ist ebenfalls spärlicher als die der letzteren und fehlt auch wohl manchmal fast ganz. In anderen Fällen sammelt sie sich hauptsächlich in der Längsachse der Eier, so daß dieselben faßförmige Gestalt annehmen, indem die Mitte aufgetrieben und die beiden Pole wie abgeschnitten aussehen.





a Befruchtetes, b unbefruchtetes Ei von *Ascaris lumbricoides* aus dem Kot. Zeiss, Compensationsocul. 8, Obj. 8,0 mm 0,16, Ap. 0,65, Tubuslänge 160 mm. Gezeichnet von Nishiuchi.

Wenn im letzteren Falle die Eiweißhüllen mehrere Höcker auf der Oberfläche bilden, ähnelt das Ganze einer abgelösten Pflanzenzelle, unterscheidet sich jedoch durch Fehlen von Stärke- und Cellulosereaktion von derselben. Ein deckelartiges oder sonstiges Gebilde ist an der Schale natürlich nicht zu finden. Die gelbe Farbe sowohl der befruchteten als auch der unbefruchteten Eier scheint dadurch hervorgebracht zu werden, daß die Eiweißhülle den Gallenfarbstoff des Kotes aufnimmt; denn die farblosen Eier sind von derselben entblößt und an den halbnackten Eiern ist nur die enthüllte Stelle farblos.

Auch in Bezug des Inhaltes zeigen die beiden Arten der Eier bedeutende Differenzen. Während die befruchteten einen rundlichen, feingranulierten, nur wenig Dotterköner einschließenden Inhalt mit sichtbarem centralen Kern besitzen, finden sich im Inneren der unbefruchteten gröbere, 0,0035—0,014 mm große, stark lichtbrechende Körner (Dotterkugeln), welche die Schale ganz ausfüllen, ohne sich kugelig zusammenzuballen und freien Raum zurückzulassen, wie es bei den befruchteten der Fall ist. Bei der Aufbewahrung der Eier an warmen Orten nehmen

1) Leuckart, Die menschlichen Parasiten. 1876. Bd. II.

die Dotterkugeln in manchen Eiern an Größe zu, indem ihre Zahl zugleich abnimmt, und schließlich findet man nicht selten an Stelle derselben feine Fettsäurenadeln angesammelt. Von einem Kern sieht man in den unbefruchteten Eiern im Kote nichts; er scheint von der Dottermasse verdeckt zu werden.

Was die Größe der Eier betrifft, so haben wir folgende Zahlen erhalten:

		Maximum	Minimum	Durchschnitt	Bemerkungen
Längsdurchmesser		0,098	0,063	0,085 mm	Aus 80 Messungen nach Yoshizawa (mit Schale)
Querdurchmesser		0,060	0,040	0,049 „	
Längsdurchmesser		0,087	0,064	0,078 „	Aus 50 Messungen nach Nishiuchi (mit Schale)
Querdurchmesser		0,050	0,031	0,040 „	
Längsdurchmesser	mit Schale	0,091	0,070	0,082 „	Aus 10 Messungen nach Miura.
	ohne „	0,077	0,063	0,069 „	
Querdurchmesser	mit Schale	0,049	0,042	0,046 „	
	ohne „	0,035	0,028	0,034 „	

Die durchschnittliche Größe aus allen diesen drei Messungen beträgt mit Schale

im Längsdurchmesser 0,0809
im Querdurchmesser 0,0450.

Vergleicht man diese Zahlen mit denjenigen der gewöhnlichen Ascarideneier, wie sie in den Büchern erwähnt werden (Längsdurchmesser 0,06, Querdurchmesser 0,04), so sind sie verhältnismäßig größer. Nur die französischen Autoren (Dujardin, Histoire nat. des helminthes. Paris 1845. p. 155; Laboulbène, Traité de médicine de Brouardel etc.) geben Zahlen an wie Längsdurchmesser 0,075—0,087, Querdurchmesser 0,058 etc. Unsere eigenen Messungen der befruchteten Ascarideneier im Kot ergaben im Durchschnitt 0,065 im Längs- und 0,049 im Querdurchmesser. Die Länge der befruchteten Ascarideneier ist also im allgemeinen etwas kleiner als die der unbefruchteten, so daß das ganze Ei mehr eine rundliche Form annimmt.

Das Vorkommen der unbefruchteten Ascarideneier im menschlichen Kote ist nicht selten. Entweder erscheinen sie mit den befruchteten zusammen oder treten ungemischt auf. Wir haben unter 35 Kranken mit Ascariden 16mal befruchtete allein und 14mal unbefruchtete allein und 5mal beide zugleich im Kote gefunden. Ferner haben wir aus 14 Kranken, in deren Kot nur unbefruchtete Eier zu finden waren, das Muttertier ausgetrieben, und zwar in 11 Fällen nur 1 Weibchen und in 3 Fällen je 2. In keinem der Fälle waren wir jedoch imstande, männliche *Ascaris* zu bekommen. Die Größe des Muttertieres wurde bei 16 Exemplaren frisch gemessen. Dieselbe betrug in der Länge durchschnittlich 232,4 mm (Maximum 300, Minimum 175 mm) und in der Dicke 4,7 mm (Maximum 7, Minimum 3 mm). Die ausgetriebenen weiblichen Ascariden wurden aufgemacht und aus dem unteren Ende des Uterus die Eier herausgeholt. Dieselben sahen fast genau so aus wie die im Kote gefundenen, nur mit dem Unterschiede, daß die Eier hier farblos und meist feiner granuliert sind und von breiterer Eiweißhülle umgeben werden. Befruchtete Eier wurden nie gefunden. Die Größe der Eier aus dem Uterus war folgende:

	Maximum	Minimum	Durchschnitt
Längsdurchmesser	0,086	0,067	0,076
Querdurchmesser	0,044	0,037	0,040

Die glänzenden Körner innerhalb dieser Eier ließen sich durch Sudan III schön rot und durch Osmium schwarz färben.

Die Leute, welche diese Eier resp. das Muttertier abgaben, waren teils gesunde Leute, teils litten sie an Neurasthenie, Typhus abdominalis, Pleuritis, Kakke, myasthenischer Paralyse, Ikterus, Myelitis u. s. w. und klagten wenig oder gar nicht über Symptome, welche auf die Anwesenheit von *Ascaris* hinweisen.

Zum Vergleiche haben wir auch mehrere *Ascaris*-Weibchen seziert, welche mit dem Männchen zusammen waren, und haben gefunden, daß sie entweder im unteren Teile des Uterus nur befruchtete Eier beherbergen oder befruchtete und unbefruchtete in verschiedenen Verhältnissen. Geht man weiter nach oben der Gegend der Samentasche zu, so findet man hier in frischen Präparaten keilförmige Samenkörper an und um die Eier in großer Anzahl. In den mit Hämatoxylin gefärbten Paraffinschnitten findet man dreieckige oder etwas abgerundete Samenkörperchen mit kleinem, scharf konturiertem, rundem Kern zwischen und in den Eiern. Im Inneren derselben findet man ganz schön Samenkern und Polspindel; letztere entweder noch in der Mitte der Zelle oder schon gegen die Oberfläche derselben vorgedrungen und im Begriffe, eine zweite Polzelle abzuschnüren u. s. w. Es ist kurz das Bild, wie man es vielfach bei der *Ascaris megalocephala* studiert hat und wie wir auch bei dieser Gelegenheit bei den Pferdeascariden, die uns Herr Prof. Janson gütigst besorgt hat, studiert haben.

Ganz anders ist das Bild bei den unbefruchteten Ascariden. Bei diesen ist sowohl frisch als auch in den mit Hämatoxylin gefärbten Paraffinschnitten kein einziges Samenkörperchen zu finden und der Kern ist im Ruhestadium mit deutlicher Kernmembran und dickem Knäuel versehen.

Wir haben endlich noch einen Versuch angestellt, um zu sehen, ob die beiden Arten von Eiern unter denjenigen Bedingungen, welche für die Entwickelung derselben günstig sind, sich verschieden verhalten. Am 17. Januar dieses Jahres haben wir zu diesem Zweck den Kot eines Kranken mit befruchteten und unbefruchteten Ascarideneiern sowie mit wenig *Trichocephalus*-Eiern in der Petri-Schale befeuchtet bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Von Zeit zu Zeit wurden Proben entnommen und mikroskopiert, aber erst gegen den 17. Mai (also nach 4 Monaten) fanden wir darin die befruchteten Eier in Furchung begriffen. Seither ging der Furchungsprozeß von Tag zu Tag weiter und es waren im Inneren der Eier 2—4 Furchungskugeln mit deutlichem Kern zu sehen und im Monat Juni war auch an einigen Eiern die Bildung von Embryonen zu konstatieren. Dagegen war im Inneren der unbefruchteten Eier keine nennenswerte Veränderung eingetreten, nur bei einigen waren die Dotterkörner zu unregelmäßig gestalteten Tropfen konfluiert; von einer Furchung war dagegen keine Rede.

Die Gründe, warum wir die von uns beobachteten Eier für unbefruchtete gehalten haben, gehen aus den obigen Zeilen hervor und bedürfen kaum mehr des Kommentars. Wir wollen hier nur die wichtigsten Punkte derselben hervorheben:

1) In den Fällen, wo im Kote nur die unbefruchteten Eier zu finden sind, kann man nur Weibchen austreiben.

2) Im Uterus solcher Weibchen finden sich keine Samenkörperchen und der Kern der Eier ist im Ruhezustande, während man beim Weibchen

welches mit dem Männchen zusammen war, befruchtete Eier mit Samen- und Eikern findet.

3) Bei der Bebrütung der unbefruchteten Eier erscheinen keine Furchungskugeln, während sie in den befruchteten unter gleichen Bedingungen gehaltenen Eiern nach gewisser Zeit aufzutreten pflegen.

Tokio, den 16. Juli 1902.

Ueber Hautdesinfektion.

Von Prof. **H. Bonhoff** in Marburg.

In der hygienischen Abteilung des Institutes für Hygiene und experimentelle Therapie in Marburg sind während der letzten zwei Jahre von meinen Assistenten, Herren Dr. Wynen und Dr. Engels, eine größere Anzahl von Desinfektionsversuchen an Händen in meinem Auftrage gemacht worden, über deren Resultate ich hier in Kürze berichten will. Die ausführlichen Arbeiten darüber werden demnächst von Herrn Dr. Engels im Arch. f. Hyg. veröffentlicht werden.

Der Meinung, daß über dies Thema in jüngster Zeit genügend verhandelt sei und daß auf diesem Gebiete wesentlich Neues vorderhand nicht gebracht werden könne, vermag ich nicht beizutreten und ich glaube, in den Resultaten der oben angekündigten Arbeiten die besten Beweismittel für diese meine abweichende Ansicht erblicken zu dürfen.

Was zunächst die Methodik der Versuche, zu denen ich hauptsächlich durch die interessanten praktischen Desinfektionsversuche des Herrn Geh. Rat Ahlfeld angeregt wurde, betrifft, so bedienten wir uns durchgehends des von Paul und Sarwey angegebenen Kastens und der von den genannten Autoren beschriebenen und in einer großen Zahl von Veröffentlichungen benutzten Versuchsanordnung. Dieselbe schien mir die beste Garantie für Ausschaltung von Fehlerquellen zu bieten und vor allem den springenden Punkt bei allen derartigen Experimenten, die Möglichkeit, die nach der Desinfektion noch haften gebliebenen bezw. aus dem Hautinneren wieder hervortretenden Keime dem Beobachter sichtbar zu machen, am besten zu berücksichtigen.

Geprüft auf ihre Wirksamkeit wurden zunächst eine Reihe bekannterer Händedesinfektionsverfahren, zum Teil um Einarbeitung in das Verfahren zu erreichen, zum Teil um ein eigenes Urteil über diese Verfahren zu bekommen; endlich um an dem Vergleiche unserer Resultate mit denen anderer Autoren einen Maßstab für die Richtigkeit unseres Vorgehens zu erhalten.

Als solche ältere Verfahren, über die ja teilweise eine sehr umfangreiche Litteratur vorliegt, wurden herangezogen: 1) die von Ahlfeld besonders ausgebildete Heißwasser-Alkoholdesinfektion, 2) der Mikulicz'sche Seifenspiritus.

Die Resultate, welche mit diesen Methoden der Händedesinfektion erhalten wurden, stimmen, wie aus der unten mitgeteilten Tabelle zu ersehen ist. vollständig überein mit denjenigen, die Paul und Sarwey selbst bei Verwendung ihres Kastens für diese Verfahren erhalten haben. Daraus konnten wir schließen, daß unser Vorgehen besondere Fehlerquellen nicht barg, und wir konnten also mit der Hoffnung, richtige und

vergleichbare Resultate zu haben, an die eigentlich gestellte Aufgabe herangehen.

Diese letztere sollte darin bestehen, zu untersuchen, ob nicht durch Auflösung gewisser Desinfektionsmittel in dem Alkohol wesentlich bessere Erfolge bezüglich der Händedesinfektion zu erreichen wären. Nun war freilich bekannt, daß einige der wichtigsten älteren Desinfektionsmittel, in Alkohol statt in Wasser gelöst, gar keine Desinfektionswirkung entfalteten. Aber was für diese Desinficientien galt, brauchte — wie ja für bestimmte Verhältnisse bereits von anderen Autoren zur Genüge erwiesen ist — nicht für alle und besonders nicht für einige neuere, schon vor Anfang der Arbeiten ins Auge gefaßte Desinfektionsmittel und für diese wenigstens nicht bei Verwendung als Hände- bezw. Hautdesinficiens zu Recht zu bestehen.

Es wurde also beschlossen, die Kombinationswirkung des Alkohols mit Formaldehyd, einem Kresolpräparate und irgend einer Quecksilberverbindung zu versuchen. Da sich bei den Versuchen mit Formaldehydalkohol bald die von Anfang an befürchtete praktische Undurchführbarkeit, wenigstens bei höheren Konzentrationen des Formaldehyds, wegen der Nebenwirkungen des letzteren auf die Haut herausstellte, waren wir gezwungen, eine Modifikation des Formaldehyds in seifiger Lösung, das Lysoform, zu den Versuchen heranzuziehen. Und als die Desinfektionserfolge mit diesem Mittel annähernd die gleichen blieben, wie sie mit dem Formaldehyd allein gewesen waren, stand fest, daß es zweckmäßig sein würde, auch bei den übrigen Stoffen, dem Kresolpräparate und dem Quecksilbersalze, es mit seifigen oder wenigstens alkalischen Lösungen zu versuchen. So wurde als ein neueres, den Anforderungen entsprechendes Kresolpräparat das Bacillol, als Quecksilberverbindung das Sublamin gewählt.

Zur Kontrolle der Wirkung dieser Desinfektionskombinationen diente immer die der wässerigen Lösung desselben Mittels, die in ebenso zahlreichen Versuchen ausgeprobt wurde. Im allgemeinen wurden mit jeder Kombination und jeder Kontrolle je 5 Desinfektionsversuche ausgeführt, bei einigen auch zahlreichere. Daneben gingen dann immer Versuche an Bakterienkulturen, die irgend an totem Material angebracht waren. Ueber letztere Versuche hier zu berichten, liegt nicht in meiner Absicht, die Resultate derselben mögen ebenso wie die Mitteilungen über Hautreizung, sonstige Giftwirkungen, Kostenpunkt u. a. in der ausführlichen Darstellung von Dr. Engels nachgesehen werden. Ich will hier nur eine Zusammenstellung der bei der Händedesinfektion erzielten Erfolge, in Tabellenform, geben. Die Resultate wurden so erhalten, daß sämtliche nach der Wirkung des Desinfektionsmittels auf die Haut der Hände gegossenen Platten in ihrer Keimzahl ausgezählt und in das von Paul und Sarwey angegebene Schema eingereiht wurden. Dann wurde festgestellt, wie hoch sich für jedes Desinfektionsmittel der Prozentsatz der sterilen Platten, der Prozentsatz der Platten mit wenigen, mit vielen und mit sehr viel Keimen belief und die so erhaltenen Zahlen in einer Tabelle untergebracht. Ich lasse hier diese Zahlen jetzt folgen (s. Tabelle p. 643).

In dieser Zusammenstellung fehlen leider die Zahlen für die wässerigen Lösungen des Formaldehyds und Lysoforms; dieselben sind mir augenblicklich nicht zugänglich. Aber ich glaube, daß auch schon so, aus den mitgeteilten Zahlen allein, zu ersehen ist, wie außerordentlich überlegen die alkoholische Lösung der verwendeten Desinficientien ist

Desinfektionsmittel	Prozentsatz der sterilen Platten	der Platten mit wenig Keimen	der Platten mit viel Keimen	der Platten mit sehr viel Keimen
Seifenspiritus	3,5	20,7	57,3	18,5
Heißwasseralkohol	29,1	64,3	6,1	0,4
1-proz. Formaldehydalkohol	58,5	36,9	4,6	—
2- „ „	79,4	17,9	2,5	—
3- „ „	26,1	66,1	7,6	—
1- „ Lysoformalkohol	63,0	36,9	—	—
2- „ „	70,7	29,2	—	—
3- „ „	52,4	44,7	2,7	—
5- „ „	50,7	49,2	—	—
1- „ Bacillolwasser	0,0	13,8	15,4	70,8
2- „ „	10,8	46,1	30,8	12,3
3- „ „	7,7	24,6	33,8	33,8
1- „ Bacillolalkohol	73,8	26,2	—	—
2- „ „	64,6	35,4	—	—
3- „ „	69,2	30,8	—	—
1-promill. Sublaminwasser	23,1	44,6	18,5	13,8
2- „ „	43,1	44,6	7,7	4,6
3- „ „	44,6	50,8	4,6	—
1- „ Sublaminalkohol	80,0	20,0	—	—
2- „ „	92,3	7,7	—	—
3- „ „	81,5	18,5	—	—

gegenüber dem Alkohol allein (Heißwasseralkohol) und gegenüber der wässerigen Lösung desselben Mittels. Auf eine genauere Besprechung der Tabelle verzichte ich an dieser Stelle. Ich will hier nur noch darauf hinweisen, daß die Möglichkeit einer völligen Sterilisierung der Haut der Hände mir durch diese Resultate wesentlich näher gerückt erscheint, als das nach den bisherigen Versuchen zu erwarten war; daß die Resultate im wesentlichen erhalten sind an den Händen einer einzigen Versuchsperson; daß die einzige Erklärung, die ich bisher für die Steigerung der Wirkung der angewendeten Desinfektionsmittel in der Alkoholkombination mir geben kann, die ist, daß es sich in der alkoholischen Lösung um eine Art „Schwebefällung“ handelt.

Es bleibt festzustellen, ob auch bei der Mehrzahl anderer „Versuchshände“ eine derartig günstige Wirkung zu erzielen ist, wie sie z. B. der 2-promill. Sublaminalkohol in unseren Experimenten entfaltet hat; ferner durch eine zweite, von Krönig und Blumberg angegebene Methode, durch Impfung der Hautoberfläche mit bestimmten Bakterienarten, die Wirkung der Alkoholkombinationen genauer zu präcisieren. Mit Versuchen in letzterer Richtung ist Herr Dr. Engels zur Zeit beschäftigt.

Ueber das baktericide Vermögen des Fluorsilbers (Tachiol Paternò) im Vergleich zum Silbernitrat, zur Karbolsäure und zum Sublimat.

Von Dr. **H. Kerez**, Zürich.

Obiges Thema wurde mir letzten Winter (Ende Januar) vom Direktor des hygienischen Institutes in Rom, Professor A. Celli, zur Bearbeitung übertragen und das Präparat (Tachiol) mir von seinem Darsteller, Senator Professor Paternò, in generöser Weise zur Verfügung gestellt, wofür ich den beiden Professoren meinen verbindlichsten Dank ausdrücke.

Bekanntlich wird die Wirkung chemischer Substanzen auf die Bakterien nach verschiedenen Methoden geprüft, je nachdem man die antiseptischen oder spezieller die baktericiden oder die sporiciden Eigenschaften der betreffenden Körper untersucht. Die bis jetzt gemachten Untersuchungen über die antiseptischen Eigenschaften verschiedener chemischer Substanzen haben gezeigt, daß oft jene, welche weniger baktericides und sporicides Vermögen besitzen, doch sehr mächtige Antiseptica sind, wie z. B. das Malachitgrün (Behring). Beim Studium der Wirkungen chemischer Substanzen auf verschiedene Bakterien ist es daher absolut notwendig, die angewandte Technik genau zu präcisieren, um die Resultate, zu denen die eine und die andere Methode führt, nicht zu verwechseln. Um das antiseptische Vermögen einer Substanz zu prüfen, genügt es ja, entweder bestimmte gewogene Mengen derselben den Kulturflüssigkeiten zuzusetzen oder in verschieden titrierte Lösungen jener Substanz bestimmte Mengen Bakterienemulsion einer Agarkultur einzuführen, und dann nach bestimmter Zeit bestimmte Mengen der Flüssigkeiten auf Agar oder Gelatine zu übertragen, um die Vitalität der Bakterien, welche mit dem Antisepticum in Kontakt waren, festzustellen.

Nach dieser Methode vorgehend, findet man, daß eine große Zahl chemischer Substanzen, zum Teil in sehr schwacher Konzentration, die Entwickelung verhindern, und zwar nicht nur in den mit dem betreffenden Antisepticum versetzten Nährböden, sondern auch bei der Passage auf frische Nährmedien. So hat Behring folgende Werte für verschiedene Antiseptica festgestellt, indem er Blutserum vom Kalbe, das Milzbrandbacillen enthielt, je 1 g dieser Substanzen zusetzte:

Cyanin und Malachitgrün	1 : 40 000
Silbernitrat	1 : 30 000
Sublimat	1 : 10 000
Trichlornatrium	1 : 1 500
Aetznatron	1 : 1 500
Chinin. muriat.	1 : 500
Acid. carbol.	1 : 500
Thymol	1 : 250
Natr. salicyl.	1 : 150
Alkohol	1 : 15
Natr. chlorat.	1 : 15

Die bei unseren Untersuchungen in Vergleich gezogenen Silber-

nitrat, Sublimat und Karbolsäure nehmen nach dieser Methode in obiger Tabelle die 2., 3. und 7. Stelle ein.

Das Fluorsilber wurde in dieser Richtung kürzlich von Inguilleri im Laboratorio batteriolog. di Sanità pubblica. Roma (Arch. di Farmacolog. speriment. e scienze affini. Anno I. Vol. I. Fasc. 2) und von Perez in der chirurg. Klinik des Prof. Durante (Vorläufige Mitteilung im Policlinico. Ende Januar 1902) untersucht. Nach obiger Methode erhielt Inguilleri folgende Resultate. In 10 Minuten tötet Fluorsilber

in 0,01 ‰-Lösung den Streptococcus pyogenes
„ 0,01 ‰ „ „ Bac. Friedlaender
„ 0,01 ‰ „ „ Bac. pestis bub.
„ 0,02 ‰ „ „ Staphylococcus aureus
„ 0,03 ‰ „ „ Bac. diphtheriae
„ 0,05 ‰ „ „ Bac. typhi
„ 0,05 ‰ „ „ Bac. tetani
„ 0,05 ‰ „ „ Bac. anthr. (vegetat. Form)
„ 0,08 ‰ „ „ Bac. anthr. (mit Sporen)

Perez will gefunden haben, daß Fluorsilber in Lösungen von $^1/_{150000}$ alle verwendeten Staphylokokken in 1 Minute tötete, in Lösungen von $^1/_{200000}$ in 10 Minuten, das Bact. coli in 3—5 Minuten, das Bact. typhi in 1 Minute; Milzbrandsporen bedurften 20—30 Minuten einer 1 ‰-Lösung.

Es schien nun, namentlich mit Rücksicht auf die erwähnten Untersuchungen des antiseptischen Wertes des Tachiols, geboten, das baktericide und sporicide Vermögen des Fluorsilbers genauer festzustellen unter Anwendung einer möglichst geeigneten Technik. Zu diesem Zwecke hielt ich es für angezeigt, eine Lösung von konstantem Titre und zwar 1 ‰ zu verwenden und das Bakterienmaterial für eine von 1 Sekunde bis zu $^1/_2$ Stunde wechselnde Zeit in einer Weise in die Lösung einzutauchen, daß die Bakterien am Träger sicher haften blieben. Letztere Gewähr bieten die von Simonetta in die Technik eingeführten Glasreiter (cavalierini), welche, feinsten gläsernen Haarnadeln ähnlich, durch Ausziehen dünnster Glasstäbe am Bunsenbrenner hergestellt werden können. Bezügliche Versuche im hygienischen Institute zu Rom (bei Prüfung einiger Teerprodukte) hatten die Zuverlässigkeit dieses Transportmaterials dargethan, während Seidenfaden sich als ganz unzuverlässig erwiesen, weil die Bakterien in der Lösung und bei den Waschungen sich loslösen. Im übrigen wurde vollständig die Technik verwendet, wie sie ausführlich von Tavernari beschrieben wurde (Annali d'Igiene sperimentale di A. Celli. Vol. X. 1900). Es möge nur erwähnt sein, daß die mit Bakterienemulsion beschickten, im Exsiccator getrockneten Glasreiter, nachdem sie bestimmte Zeiten in der Desinfektionsflüssigkeit verweilt hatten, einem kräftigen Strahle sterilisierten, destillierten Wassers ausgesetzt wurden; darauf kamen sie in Glycerinbouillon in den Thermostaten bei 37° und wurden nach 2—3 Tagen geprüft, auch mikroskopisch und nötigenfalls kulturell untersucht, um sich von Sterilität oder Entwickelung zu überzeugen und in letzterem Fall die Identität der Art festzustellen. Zugleich wurde das baktericide Vermögen des Fluorsilbers mit jenem des Silbernitrats, der Karbolsäure und des Sublimats verglichen und zwar in gleicher Konzentration von 1 ‰. Daneben schien es opportun, auch 5-proz. Karbolsäure in Vergleich zu ziehen und letztere statt des Sublimats und des Silbernitrats da mit dem Fluorsilber im baktericiden Vermögen

zu vergleichen, wo jene beiden aus bekannten chemischen Gründen nicht wohl verwendbar sind, wie bei tuberkulösem Sputum und Milzbrandblut. Für die Einwirkung auf Tuberkelbacillen im Sputum wurde von 1 ‰ Karbolsäure abgesehen, weil die geringe Wirkung solcher Lösungen bekannt ist.

Beim Vergleiche mit Sublimat wurden die Glasreiter aus letzterem für 5 Minuten in eine Lösung (10-proz.) von Schwefelkalium gebracht, um die Wirkung des Sublimats zu neutralisieren, und dann mit sterilisiertem, destilliertem Wasser ausgewaschen, bevor sie in die Bouillon kamen.

Bei der Prüfung des Silbernitrats wurde letzteres vor der Waschung der Glasreiter mit destilliertem Wasser erst mit physiologischer Kochsalzlösung neutralisiert.

Für die Untersuchungen mit tuberkulösem Sputum wurden kleine Glasscheibchen verwendet, weil das zähe Material durch Kompression und Ausstreichen zwischen 2 Scheibchen sich gleichmäßiger in dünner Schicht fixieren ließ als an den Glasreitern.

Es wurde tuberkulöses Sputum verwendet und nicht Kulturen des Tuberkelbacillus, weil die Vitalität und Virulenz dieser letzteren zu großen Schwankungen unterworfen ist. Die mit tuberkulösem Sputum beschickten, 2 Stunden im Exsiccator getrockneten Lamellen wurden nach Einwirkung des zu prüfenden Desinfektionsmittels aus diesem direkt in halboffenen Petri-Schalen in den Thermostaten gebracht und daselbst zur vollständigen Austrocknung für 12 Stunden bei 37° belassen. Das von den Lamellen abgekratzte und emulsionierte Material wurde Meerschweinchen subkutan unterhalb der Leiste geimpft.

Um die nötige Zeit, Tuberkulosebacillen im natürlichen, feuchten Sputum abzutöten, ausfindig zu machen, wurden einige Versuche mit Partikeln stark bacillenhaltigen Sputums angestellt, welche nach Verweilen im Desinfektionsmittel 3mal in Petri-Schalen ausgewaschen und dann, in sterilisiertem Wasser emulsioniert, Meerschweinchen injiziert wurden.

Als Testobjekte dienten der Staphylococcus aureus, der Bac. typhi Eberth, die vegetative Form des Bac. anthracis (Blut infizierter Versuchstiere) und tuberkulöses Sputum.

Resultate:

I. Staphylococcus aureus.

	0	30″	1′	3′	5′	6′	7′	8′	9′	10′	15′	20′	25′	30′
	Kontrolle													
Tachiol 1 ‰	+	+	+	+	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Arg. nitr. 1 ‰	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–

II. Bac. typhi abd.

	0	30″	1′	3′	5′	6′	7′	8′	9′	10′	15′	20′	25′	30′
	Kontrolle													
Tachiol 1 ‰	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Arg. nitr. 1 ‰	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–

III. Vegetative Form des Bac. anthracis.

	0	1′	2′	3′	4′	5′	10′	15′	20′	25′	30′	40′
	Kontrolle											
Tachiol 1 ‰	+	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	
Acid. carbol. 1 ‰	+	+	+	+	+	+	+	+	±	–	–	–
Acid. carbol. 5 %	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	

IV. Tuberkulöses Sputum auf Glaslamellen.

Dauer der Einwirkung	von Tachiol 1‰	von Acid. carbol. 5 %
0 (Kontrolltier)	† Tuberkulose	† Tuberkulose
1'	† Tuberkulose	Meerschweinchen nach 29 Tagen getötet, Tuberkulose
5'	† nach 3 Tagen, Sektion negativ	† Tuberkulose
15'	† Tuberkulose	† nach wenigen Tagen, Sektion negativ
30'	† Tuberkulose	† Tuberkulose
40'	† Tuberkulose	† Tuberkulose
50'	Meerschweinchen nach 18 Tagen getötet, Tuberkulose	† Tuberkulose
60'	† Tuberkulose	† Tuberkulose
1½ Stunden	† Tuberkulose	† nach 3 Tagen, Sektion negativ
2 Stunden	Nach 18 Tagen getötet, Tuberkulose	† Tuberkulose
2½ Stunden	Nach 18 Tagen getötet, Tuberkulose	† Tuberkulose
3 Stunden	† Tuberkulose	† Tuberkulose

V. Tuberkulöses Sputum in Stat. natur.

Dauer der Einwirkung	von Tachiol 1‰	von Acid. carbol. 5‰
0 (Kontrolltier)	† Tuberkulose	dito
10 Stunden	† nach 3 Tagen, Sektion negativ	† Tuberkulose
11 Stunden	Getötet nach 18 Tagen, Tuberkulose	† Tuberkulose
12 Stunden	Getötet nach 18 Tagen, Tuberkulose	Getötet nach 18 Tagen, Tuberkulose

Es sei noch erwähnt, daß die in den Tabellen I, II, III und der folgenden VI niedergelegten Untersuchungen mehrere Male wiederholt wurden, um die Resultate zu verifizieren.

Aus obigen Tabellen ergiebt sich, daß

Fluorsilber 1‰ den Staphyloc. aureus in 6' tötet,
" " Bac. typhi " 30" " während
Arg. nitr. 1‰ " Staphyloc. aureus " ½' "
" " " Bac. typhi " 30" "
Fluorsilber 1‰ tötet Bac. anthracis (vegetative Form) in 2'
Ac. carbol. 5% " " " innerh. " 1',
wogegen Ac. carbol. 1‰ 20—25 Minuten hierzu bedarf.

Wie immer bei Inokulation tuberkulösen Sputums, sind einige Versuchstiere (4 von 32) nach wenigen Tagen mit negativem Sektionsbefund eingegangen; bei allen anderen Tieren wurde unzweifelhafte Tuberkulose konstatiert.

Der Bac. tubercul. widersteht also im Sputum sowohl Fluorsilber in 1‰ als Karbolsäure in 5-proz. Lösung in feuchtem Zustande mindestens 12 Stunden, auf Glaslamellen angetrocknet, weit mehr als 3 Stunden, da ja das Desinficiens auch noch während der 12 Stunden dauernden Austrocknung im Thermostaten weiter wirken konnte.

Diese Resultate mit tuberkulösem Sputum differieren mit denen mancher Autoren, aber es hat dieses nichts Auffälliges, wenn man bedenkt, um wie sehr heterogenes, variierendes Material es sich handelt und wie sehr überhaupt die bezüglichen Angaben divergieren.

Um das sporicide Vermögen des Tachiols sowie vergleichend das des Silbernitrats und des Sublimats zu prüfen, wurden

Glasreiter mit Emulsionen von Milzbrandkulturen beschickt, die auf Kartoffeln bei 37° gewachsen waren; im weiteren war das Procedere das nämliche, wie bei den in Tabelle I, II und III figurierenden Untersuchungen. Die Resultate zeigt folgende Tabelle:

VI. Milzbrandsporen.

	1′	5′	10′	15′	20′	25′	30′	45′	50′	55′	60′	65′	70′	80′	90′	
Tachiol 1‰	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—	—	—	Kultur I
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			Kultur II
						+	+	+			—			—	—	Kultur III
Argent. nitr. 1‰									+		+	+	+			Kultur II
						+		+			—			—	—	Kultur III
Sublimat 1‰	+	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	Kulturen I, II, III

Wie aus vielen Untersuchungen anderer Autoren, ist auch aus diesen ersichtlich, wie sehr die Virulenz verschiedener Milzbrandsporen variiert, selbst wenn dieselben unter ganz gleichen Bedingungen gezüchtet sind. Es kann daher nur gesagt werden, daß vorliegendes Sporenmaterial sowohl Fluorsilber als Silbernitrat in 1‰-Lösung mindestens 45′, aber auch bis 1 Stunde und 10 Minuten Widerstand leistete, während Sublimat in nämlicher Konzentration innerhalb 25 Minuten sämtliche zur Untersuchung gekommenen Sporen vernichtete.

Die Differenz dieser Resultate von jenen, die Inguilleri und Perez erhalten haben, erklärt sich sowohl durch die Variabilität verschiedener Milzbrandsporenstämme als auch durch die Verschiedenheit der angewandten Untersuchungsmethoden.

Schlußfolgerungen.

Aus obigen Untersuchungen geht hervor, daß Fluorsilber (Tachiol) ziemlich das gleiche baktericide und sporicide Vermögen besitzt wie das Silbernitrat.

Beide Silbersalze werden in der sporenvernichtenden Wirkung von dem hierin souveränen Sublimat weit übertroffen.

Die Karbolsäure weist nur in 5-proz. Lösung höheres baktericides Vermögen auf als 1‰-Lösungen der beiden Silbersalze.

Als Desinficiens für tuberkulöses Sputum scheint das Tachiol, wie andere Salze, sich wenig zu eignen.

Da aber das Fluorsilber Eiweißkörper in schwachem Grade koaguliert und nach den Angaben von Inguilleri und Perez geringe Toxicität besitzt, dürfte solches im Hinblick auf sein oben festgestelltes baktericides Vermögen als ein gutes Desinficiens betrachtet werden.

Zum Schlusse fühle ich mich gedrungen, Herrn Prof. A. Celli für seine freundliche Aufnahme im Institute, besonders aber Prof. O. Casagrandi für seine äußerst gefällige Direktive und Unterstützung meiner Untersuchungen, sowie Dr. Tedaldi für seine große Liebenswürdigkeit meinen besten Dank zu sagen.

Nachdruck verboten.

Einwirkung von Mikroorganismen auf einige chemische Normallösungen.

[Aus dem bakteriologischen Laboratorium des eidgenössischen Polytechnikums Zürich.]

Von Dr. **Heinrich Beck** aus Frankfurt a. M.

Den Anstoß zu vorliegender Arbeit gab eine im bakteriologischen Laboratorium gelegentlich der Aufbewahrung verdünnter Lunge-Zeckendorff'scher Lösung gemachte Beobachtung.

Wie ich später zeigen werde, hatte sich eine solche Lösung nach verhältnismäßig kurzer Zeit entfärbt.

Gewisse Beobachtungen legten die Vermutung nahe, daß hierbei die Einwirkung von Mikroben eine Rolle spiele.

Auf Veranlassung des Herrn Prof. Roth hin habe ich nun diese Frage näher studiert und meine Aufgabe insofern erweitert, als ich auch andere Normallösungen miteinbezogen habe.

Bei dem Studium der diesbezüglichen Litteratur ist es mir aufgefallen, wie wenig Angaben zu finden sind über die allfälligen Veränderungen von aufbewahrten Titreflüssigkeiten durch Mikroben. Es hat dies wohl seinen Grund mit darin, daß den meisten praktischen Chemikern, die mit solchen Lösungen arbeiten, bislang die bakteriologischen Untersuchungsmethoden nicht geläufig waren.

Einschlägige Arbeiten, die ich in der sehr zerstreuten Litteratur auffinden konnte, beziehen sich eigentlich fast nur auf Oxalsäure, welche ich auch bei meinen Untersuchungen besonders berücksichtigte, indem ich die bereits erschienenen Arbeiten einer Nachprüfung unterzog und in mir nötig erscheinender Weise ergänzte.

Die Untersuchungen über das Lunge-Zeckendorff'sche Reagens schicke ich hier voraus.

In der hygienischen Praxis findet die Lunge-Zeckendorff'sche Methode [1]) häufige Verwendung, um den CO_2-Gehalt der Luft bewohnter Räume auf einfache und auch dem Nichtchemiker zugängliche Weise zu bestimmen.

Dieselbe beruht auf der Entfärbung einer sehr verdünnten, mit Phenolphtaleïn gefärbten Sodalösung von bestimmter Konzentration durch die Kohlensäure der Luft.

Das Reagens wird folgendermaßen bereitet. 5,3 g reine, wasserfreie Soda oder 14,3 $Na_2CO_3 + 10\,H_2O$ werden unter Zufügung von 0,1 g [2]) Phenolphtaleïn im Wasser aufgelöst und nach erfolgter Lösung zum Liter ergänzt. Es entsteht eine dunkelrot gefärbte Flüssigkeit. Diese stellt die Stammlösung dar, welche sich in gut verschlossenen Flaschen monatelang halten soll. Unmittelbar vor Gebrauch giebt man 2 ccm obiger Vorratslösung zu 100 ccm frisch ausgekochtem, kohlensäurefreiem Wasser,

1) Zeitschr. f. angewandte Chemie. 1888. Heft 14 und 1889. Heft 1.

2) In den Originalmitteilungen des Herrn Prof. Lunge findet sich eine Phenolphtaleïnzugabe von 1‰ angegeben. In Lehmann's Methoden der praktischen Hygiene. 2. Aufl. p. 139 ist ein Zusatz von 0,1 g Phenolphtaleïn pro Liter Stammlösung empfohlen.
Bei Herstellung meiner Lösungen befolgte ich letztere Vorschrift, da ich annahm, daß sie in allgemeinem Gebrauch sei.

welches man nach der Vorschrift darstellt, indem man destilliertes Wasser eine Zeit lang kocht und dann verschlossen erkalten läßt. Hiervon füllt man 10 ccm in den Apparat, der aus einem kleinen, ca. 50 ccm haltigen Glasgefäß besteht, dessen Hals mit einem festschließenden Gummistopfen versehen ist, durch welchen zwei Glasröhren einführen.

Eine derselben reicht bis fast auf den Boden der Flasche und steht mit einem mit Ventilen versehenen Gummiballon in Verbindung. Die Flasche muß vor dem Versuche mit der zu untersuchenden Luft gefüllt werden. Nun läßt man durch langsames aber vollständiges Zusammenpressen des Ballons — dessen Rauminhalt natürlich bekannt ist — die zu untersuchende Luft durch das Reagens strömen. Hierauf wird je 1 Minute lang geschüttelt und dann wiederum Luft durchgeleitet. Man setzt dies solange fort, bis Entfärbung der Lösung eintritt[1]). Eine dem Apparate beigegebene Tabelle gestattet es, den CO_2-Gehalt der geprüften Luft direkt aus der Anzahl der zur Entfärbung notwendig gewesenen Ballonfüllungen abzulesen.

Während also das Verfahren an sich an Einfachheit nichts zu wünschen übrig läßt, ist es doch gelegentlich für den praktischen Hygieniker — z. B. für den auf der Reise befindlichen Fabrikinspektor — nicht immer leicht, sich frisch bereitetes CO_2-freies Wasser zu beschaffen, auch steht demselben für die Vornahme der Verdünnung und Abmessung der Lösung nicht immer ein genügend kohlensäurefreier Raum zur Verfügung. Finden diese Operationen aber in dem Versuchsraume selbst statt, so ist hierdurch schon eine erhebliche Fehlerquelle gegeben. Herr Professor Roth hatte deshalb versucht, die jeweilen für eine Bestimmung nötigen 10 ccm der verdünnten Gebrauchslösung in kleine Fläschchen von ebenso viel Inhalt einzufüllen und in denselben — vor Luftzutritt geschützt — für späteren Gebrauch aufzubewahren.

Der Verschluß wurde durch gut schließende Korken mit Paraffinüberzug bewerkstelligt, um eine Einwirkung der Kohlensäure des Aufbewahrungsraumes vollständig auszuschließen.

Trotzdem zeigte es sich, daß nach einiger Zeit die Lösung anfing, sich zu entfärben. Es fand dieser Vorgang aber nicht in allen Fläschchen gleichzeitig statt, sondern es waren schon einige ganz entfärbt, während andere erst eine hellere Farbe angenommen hatten.

Als dann ein Fläschchen mit der entfärbten Lösung bakteriologisch untersucht wurde, fanden sich sehr viele Bakterien, die sich bei näherer Untersuchung hauptsächlich als Bacillus fluorescens liquefaciens erwiesen. Die Möglichkeit einer Bakterienwirkung war also gegeben.

Es schien mir daher angezeigt, die Frage zu prüfen, ob dieses Bakterienwachstum mit der Veränderung der erwähnten Lösung in Zusammenhange stehe, zu welchem Zwecke ich folgende Untersuchungen anstellte.

Vorerst untersuchte ich den Rest der vorhin erwähnten Fläschchen auf Pilze und fand in sämtlichen Bacillus fluorescens liquefaciens vor. Schimmelmycel konnte ich nirgends bemerken, trotzdem wuchsen auf einigen Platten reichlich Kolonieen von Penicillium glaucum, welcher Schimmel wohl in Form nicht zur Auskeimung gelangter Konidien in der Lösung gewesen war.

---

1) Bei aus älteren Stammlösungen hergestellten Gebrauchsflüssigkeiten tritt der Umschlag von rot in gelblich ein. Bei Lehmann, Praktische Hygiene, ist dies als Endresultat angegeben.

Da ich in allen untersuchten Fläschchen fast nur Bacillus fluorescens liquefaciens vorgefunden hatte, glaubte ich meine ferneren Versuche ausschließlich mit diesem machen zu sollen. Es fragte sich nun, wie die Infektion der Fläschchen zustande kam. Wenn man das Wasser, welches zur Verdünnung der Stammlösung dienen soll, einige Zeit gekocht hat und mit Gummipfropfen erkalten läßt (wie ja auch die Vorschrift lautet), so dürfte, da die in Frage kommende Bakterienart keine Sporen bildet, dieser Bacillus sicher abgetötet sein. Durch das zur Verdünnung dienende Wasser konnte also die Lösung nicht infiziert werden. Ebenso ergab die Untersuchung, daß die zur Bereitung des verdünnten Reagens dienende Stammlösung kein Fluorescens liquefaciens enthielt. Da dieser jedoch zu den allerhäufigsten Wasserbakterien gehört und auch in anderen Medien keineswegs selten vorkommt, so ist seine Anwesenheit im Reagens nicht schwer erklärlich, falls nicht überall trockene, sterile Gefäße zur Anwendung gelangen, da z. B. die in den Flaschen befindlichen Reste des zur Reinigung dienenden Wassers genannte Bacillen enthalten können. Daß in chemischen Laboratorien ein Sterilisieren von Geräten und Flaschen aber nicht gebräuchlich, ist bekannt.

Um nun Bakterienwirkung nach Möglichkeit auszuschließen, füllte ich frisch bereitete Lunge-Zeckendorff'sche Gebrauchslösung in Reagensröhren ein, die vorher sterilisiert waren. Die Röhrchen wurden vor dem Einfüllen der Lösung samt dem Wattepfropfen in üblicher Weise im Trockenschrank sterilisiert und nach demselben $^3/_4$ Stunden dem strömenden Dampfe ausgesetzt. Nach dem Erkalten (vor dem Fenster) wurden die Wattepfropfen etwas weiter in die Röhrchen hineingeschoben und der leere Raum bis zum Rande der Röhrchen mit Paraffin zugegossen.

Am nächsten Tage waren einige Röhrchen entfärbt; nach 5 Tagen alle.

Durch die Plattenmethode konnte ich die Sterilität der Röhrchen feststellen. Da ich durch die Art des Verschlusses das Eindringen von Kohlensäure aus der umgebenden Luft ausgeschlossen glaubte, so dachte ich an die Möglichkeit einer eingeleiteten Zersetzung des Phenolphtaleïns durch die Soda beim Kochen. Es stellte sich jedoch heraus, daß alles Phenolphtaleïn noch vorhanden war, daß jedoch die Flüssigkeit durch Aufnahme von CO_2 genanntem Indikator gegenüber nicht mehr alkalisch reagierte. Es trat wieder Rotfärbung ein auf Zusatz einer Spur von Natronlauge.

Es erscheint unwahrscheinlich, daß bei wirklich luftdichtem Verschluß der Röhrchen die Lösung sich auf diese Weise entfärben konnte.

Wenn man jedoch erwägt, welche geringe Menge Soda in den 10—15 ccm jedes Röhrchens enthalten sind und welche geringe Menge CO_2 nötig ist, um die Entfärbung darin herbeizuführen, wurde es mir wahrscheinlich, daß die Spuren Luft, die sich in dem Wattebausch befanden, an der Entfärbung schuld waren. War es doch nicht ausgeschlossen, daß die umgebende Luft beim Auftropfen des Paraffins sehr kohlensäurehaltig war wegen der sich in der Nähe befindenden Flammen. Ich will hier noch bemerken, daß das Abbrennen des Wattebausches, wie dies in bakteriologischen Laboratorien üblich ist, um ein Miteinbringen von anhängenden Keimen zu verhindern, die Entfärbung der Lösung in kürzester Zeit herbeigeführt werden kann. Ich unterließ deshalb dieses Ansengen der Wattepfropfen. Der mit Paraffin abgedichtete Watteverschluß erwies sich also als ungeeignet und ich ver-

suchte den Verschluß mit Korken. Dieselben wurden vorher in Wasser ausgekocht und so die in den Poren befindliche Luft möglichst vollständig entfernt. Der Verschluß wurde in der Weise bewerkstelligt, daß ich die noch von der Sterilisation im Dampftopf heißen Röhrchen mit den gut schließenden, wie oben angegeben behandelten Korken verschloß, dann mit Paraffin überkleidete und einen Teil davon ungeimpft aufbewahrte. Die ca. 3 Wochen aufbewahrten Lösungen erwiesen sich später bei ihrer Untersuchung als völlig unverändert.

Ein anderer Teil der keimfrei gemachten Lösung wurde nun mit Bacillus fluorescens liquefaciens geimpft und nebst den Kontrollröhrchen teils bei 22° C, teils bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Die Beimpfung geschah durch Einbringen einer geringen Menge Agar-Fluorescenskultur, welche aus Lunge'schem Reagens gezüchtet war. Es wurde darauf gesehen, daß kein Nährboden mit in die Lösung gebracht wurde.

Es handelte sich nun darum, ob die ganz oder teilweise entfärbten Lösungen noch für die Luftuntersuchung zu verwenden seien, vielleicht in der Weise, daß durch einen Zusatz von einigen Tropfen Phenolphtaleïn die rote Farbe wiederhergestellt würde. Dies wäre wohl angängig, wenn, was ich in erster Linie annahm, eine Zerstörung (Reduktion?) des Farbstoffes die Schuld an der Entfärbung getragen hätte.

Daß dies in der That unter Umständen der Fall sein kann, beweist mir der Umstand, daß bei der in der Einleitung erwähnten, früher beobachteten Veränderung der Lösung die Veränderung des Indikators eine Rolle gespielt hatte, was daraus hervorging, daß ein weiterer Zusatz von Phenolphtaleïnlösung die Farbe wiedererscheinen ließ. Es zeigte sich jedoch, daß bei meinen Versuchen in den beimpften Lösungen das Phenolphtaleïn nicht verschwunden war, sondern daß das Reagens seine Alkalität verloren hatte, d. h. gegenüber Phenolphtaleïn; gegen Lackmus reagierte es noch alkalisch.

Es war also hier von einer praktischen Verwertung nicht die Rede.

Um nun festzustellen, ob Bacillus fluorescens liquefaciens überhaupt imstande ist, Phenolphtaleïn zu zerstören, machte ich folgende Versuche.

I. Nährgelatine wurde so stark mit Na-Lauge alkalisch gemacht, daß sie durch Phenolphtaleïn rot gefärbt wurde. Das Phenolphtaleïn verrieb ich zum Zwecke der Löslichmachung mit einigen Kubikcentimetern $^1/_1$ N-Lauge in einer Reibschale und filtrierte durch ein kleines Filter 2—3 Tropfen dieser Lösung zur alkalisch gemachten Gelatine. Hierauf wurde sterilisiert.

II. Peptonwasser wurde gleichfalls mit einigen Tropfen obiger Phenolphtaleïnlösung versetzt und nochmals sterilisiert. Gelatine und Peptonwasser beimpfte ich mit Bacillus fluorescens liquefaciens und bewahrte einige Röhrchen der rot gefärbten Gelatine und des Peptonwassers zur Kontrolle auf. Nach 2 resp. 3 Tagen waren die geimpften Gelatine- und Peptonwasserröhrchen entfärbt, die Kontrollröhrchen jedoch noch rot. Zusatz von 1 Tropfen Natronlauge färbte aber die beimpften und durch das Bakterium entfärbten Nährböden wieder ebenso stark rot als sie es ursprünglich waren. Auch noch nach 8 Tagen gelang dieser Versuch. Es ist also hierdurch bewiesen, daß Phenolphtaleïn durch das reduzierende Ferment des Bacillus fluorescens liquefaciens nicht verändert und nicht etwa, wie sich annehmen ließe, zu Phtalin reduziert wird.

Ich will hier noch auf den Umstand hinweisen, daß die Entfärbung von größeren Mengen gebrauchsfertiger Lunge-Zeckendorff'scher Lösung durch Bakterienwirkung sehr lange Zeit in Anspruch nimmt.

Schon in Fläschchen von 150 ccm Inhalt, die ganz mit dem Reagens gefüllt sind, dauerte es mehrere Wochen, bis die Entfärbung bemerkbar war. Es ist dies durch die erforderliche CO_2-Menge erklärlich, die hier außerordentlich viel größer ist, als für die nur ca. 10—15 ccm enthaltenden Proberöhrchen.

Um nun zu prüfen, ob die sterilisierte und nicht entfärbte Lösung auch wirklich unverändert und zum praktischen Gebrauch noch tauglich geblieben wäre, verglich ich den Inhalt 14 Tage alter Röhrchen, welche ihre Färbung unverändert gehalten hatten, mit einer frisch bereiteten Gebrauchslösung und zwar, da es sich, wie schon früher erwähnt, um die Frage der praktischen Verwendbarkeit handelte, mittels des Luftprüfers in der Weise, daß ich feststellte, ob die zur Entfärbung der beiden Vergleichslösungen nötigen Luftquanta dieselben wären. Zur Vermeidung von Versuchsfehlern, die sich wegen des stets wechselnden Kohlensäuregehaltes der Zimmerluft leicht hätten bemerkbar machen können, machte ich die Untersuchungen mit den beiden Lösungen zur selbigen Zeit und an selbiger Stelle mittels zweier Luftprüfer.

Die Lufteinsaugeöffnungen beider Apparate wurden dicht bei einander befestigt und mußte deshalb unter allen Umständen gleichartige Luft in beide Gebläse eingesaugt werden. Ferner wurden die Gummiballons beider Apparate auf gleichen Rauminhalt geprüft. In das Fläschchen des einen Apparates goß ich die zu prüfende Flüssigkeit, in dasjenige des anderen die Kontrolllösung. Es wurden jedesmal mindestens zwei Bestimmungen gemacht und dabei regelmäßig die Apparate gewechselt, so daß einmal die Kontrollflüssigkeit sich in einem, ein andermal im anderen Apparate befand. Die Resultate dieser Versuche s. Tabelle p. 654.

Um der Frage näherzutreten, ob auch Stammlösungen sich längere Zeit gebrauchsfähig erhalten, prüfte ich eine solche, die aus dem Jahre 1897 stammte und einen Gehalt von Phenolphtaleïn von 1,0 g pro Liter aufwies. Dieselbe war rotbraun gefärbt. Aus ihr hatte ich eine Hefenart und einen Schimmel gezüchtet. Erstere schwamm in Form kleiner Inseln auf der Flüssigkeit, letzterer befand sich auf dem Grunde der Lösung. Schimmel und Hefen waren nur äußerst spärlich nachweisbar, Bakterien keine. Das aus der Lösung hergestellte verdünnte Reagens war bräunlich gefärbt und ließ die eingetretene Endreaktion nicht deutlich erkennen, da die Flüssigkeit hierbei nicht farblos, sondern gelblich wurde.

Zweitens untersuchte ich in gleicher Weise eine Lösung aus dem Jahre 1896. Gehalt an Phenolphtalein 0,1 g pro Liter.

Die Lösung war nur noch blaßrot, das daraus gewonnene verdünnte Reagens fast farblos, konnte jedoch mit etwas stark verdünnter alkoholischer Phenolphtaleinlösung wieder aufgefärbt werden und hatte dann genau die Farbe der aus frischer Stammlösung bereiteten Gebrauchslösung.

Die Resultate der Versuche sind in folgender Tabelle (p. 654) zusammengestellt.

Aus diesen Versuchen geht Folgendes hervor. Die aus dem Jahre 1897 stammende braunrot verfärbte Stammlösung ist verdorben. Da es mir nicht bekannt ist, wie oft diese Flasche geöffnet wurde, so können aus dieser Prüfung keine Schlüsse gezogen werden, ob die Lösung an

Art der Lösung	Zahl der zur Entfärbung nötigen Füllungen	Zahl d. erforderlichen Füllungen bei der Vergleichslösung
Sterilisierte Lösung	9 (810)[1]	9 (810)[1]
„ „	8 (720)	6 (540)
„ „	6 (540)	6 (540)
Geimpfte, noch nicht entfärbte Lösung	5 (450)	7 (630)
	6 (540)	7 (630)
Stammlösung von 1897 mit 1,0 g Phenolphtaleïn pro Liter	7 (630)	9 (810)
	5 (450)	7 (630)
Stammlösung von 1896; 0,1 g Phenolphtaleïn pro Liter enthaltend (wurde mit alkohol. Phenolphtaleïn aufgefärbt)	7 (630)	7 (630)
	5½ (495)	5½ (495)
	6 (540)	6 (540)

sich nicht haltbar sei, oder ob etwa die in derselben vorhandenen Pilze eine Veränderung hervorgebracht hätten. Die Lösung vom Jahre 1896 war aber noch in ursprünglicher Stärke, trotzdem ihre Farbe, wie schon vorhin erwähnt, blaßrot geworden war.

Die sterilisierte Gebrauchslösung hatte ebenfalls brauchbare Resultate ergeben. Daß die sterilisierte Lösung einmal einen Mehrverbrauch von 2 Füllungen aufwies, ist augenscheinlich einem Versuchsfehler zuzuschreiben, da es ausgeschlossen erscheint, daß sie um soviel stärker geworden sein könnte. Sonst zeigte die sterilisierte Lösung keine Unterschiede gegenüber der frisch zubereiteten.

Was die beimpfte, aber noch nicht vollständg entfärbte Lösung anbetrifft, so war dieselbe erheblich schwächer geworden.

Faßt man alle vorstehend erwähnten Versuchsresultate zusammen, so ergeben sich folgende Schlußfolgerungen.

I. Es ist erwiesen, daß durch die Einwirkung von zur Fluorescens-Gruppe gehörenden Bakterien eine Entfärbung der verdünnten Lunge-Zeckendorff'schen Lösung herbeigeführt werden kann[2]).

II. Durch Sterilisation können die eventuell in der Lösung vorhandenen Bakterien abgetötet und dadurch eine für den praktischen Gebrauch genügende Haltbarkeit derselben herbeigeführt werden.

III. Hat die Stammlösung unter Umständen eine sich auf mehrere Jahre erstreckende, also für die Praxis mehr als ausreichende Haltbarkeit. Eine Entfärbung derselben kann ohne Bakterienwirkung durch Veränderung des Farbstoffes herbeigeführt werden, was aber auf die praktische Verwendbarkeit keinen Einfluß ausübt.

1) Die eingeklammerten Zahlen geben die Menge der durch das Reagens getriebenen Luft in Kubikcentimeter an.

2) Die eingangs erwähnte Beobachtung an Lösungen, die durch Aufbewahrung entfärbt worden sind, sich aber nach Zusatz von Phenolphtaleïn wieder färbten, steht allerdings hiermit nicht in Einklang und beweist, daß auch der Farbstoff zerstört werden kann. Indes ist nicht ausgeschlossen, daß hier eine Lichtwirkung mit im Spiele war.

Oxalsäurelösungen.

Daß verdünnte, wässerige Lösungen von Oxalsäure ihren Titre ändern, d. h. mit der Zeit schwächer werden, oder selbst ihre Acidität ganz verlieren, ist schon seit langem bekannt. Man schrieb diese Veränderung der Einwirkung des Lichtes zu und findet auch deshalb häufig die Vorschrift, Oxalsäurelösungen zur Titrieranalyse im Dunkeln aufzubewahren und dadurch vor Zersetzung zu schützen.

Nach Richardson[1]) zersetzt sich wässerige Oxalsäurelösung unter der Einwirkung des Lichtes und des Sauerstoffs zu CO_2 und H_2O_2. Bei ungenügendem Sauerstoffzutritt aber zu CO_2 und H_2O.

Bizio[2]) hat schon in den Jahren 1870 und 1883 diesen Vorgang des Schwächerwerdens obiger Lösung beobachtet und als einfache Oxydation erklärt.

Mit diesen Angaben steht nicht im Einklang, daß einige ältere Autoren kein CO_2 in den zersetzten Lösungen fanden.

Es sind auch Vorschläge gemacht worden, durch Zusätze die spontane Zersetzung der Oxalsäurelösungen zu verhindern, so von E. Riegler[3]), welcher vorschlug, diese Lösung durch Zusatz von Schwefelsäure haltbar zu machen. Natürlich ist ein solcher Zusatz nur bei der Titration mit Kaliumpermanganat statthaft und nicht bei der Alkalimetrie.

Prof. Treadwell[4]) macht einige Angaben über die Haltbarkeit von Oxalsäurelösungen mit und ohne Zusatz von Schwefelsäure; dieselben sind in folgender Tabelle zusammengestellt.

	Wässerige Oxalsäurelösung	Schwefelsäurehaltige Oxalsäurelösung
frisch	1000 ccm = 1000,6 ccm $\frac{N}{10}$ - Lösung	1000 ccm = 1002,5 ccm $\frac{N}{10}$ - Lösung
nach 8 Monaten	1000 ccm = 994,9 ccm $\frac{N}{10}$ - Lösung	1000 ccm = 1001,8 ccm $\frac{N}{10}$ - Lösung

Die schwefelsäurehaltige Lösung hatte also in 8 Monaten 1,2 Promille, die wässerige dagegen 5,6 Promille an Wirkungswert eingebüßt.

Wittstein[5]) hat $2^1/_2$ Monate lang (April, Mai und Juni) in weißen, hermetisch verschlossenen Gefäßen 5-proz. Oxalsäurelösung dem Lichte exponiert. Nach Ablauf obiger Zeit enthielt die Lösung nur noch 4,643 Proz. Säure. Wittstein erwähnt noch Arbeiten von Döbereiner, Ebelmann, Draper, Niepce und Corvisart, ferner die von Seekamp, welche jedoch, da es sich hierbei nicht um reine Oxalsäurelösungen handelt, übergehen werden können.

Während in diesen Arbeiten nur von einer Einwirkung des Lichtes die Rede ist, hat doch schon frühzeitig die Beobachtung des Auftretens von Schimmelmycel in solchen zersetzten Oxalsäurelösungen die Vermutung nahegelegt, daß es sich um eine Wirkung der Pilze handeln könne.

W. Gerland[6]) empfiehlt den Zusatz von einem Krystall Thymol,

1) Berichte 27 Refer. 496.
2) Ref. Jahresbericht. 1870. p. 643; Ref. Zeitschr. f. analyt. Chemie. Bd. IX. p. 392.
3) Zeitschr. f. analyt. Chemie. 1896. p. 522.
4) Lehrb. d. analyt. Chemie. Bd. II. p. 401/402.
5) Vierteljahrsschr. f. prakt. Pharmacie. Bd. XI. p. 573.
6) Ref. Chem. Centralbl. 1870. Bd. I. p. 470.

welches weder bei der Alkalimetrie noch bei der Einstellung gegen Permanganat störend wirken soll. Er scheint also wohl an die Möglichkeit einer Mikrobenwirkung gedacht zu haben.

Werner[1]) macht hierüber weitere Mitteilungen. Er arbeitete mit einer Lösung von 0,4 g Oxalsäure im Liter (ca. $^1/_{150}$ Normal) und fand, daß diese Lösung innerhalb 6 Wochen ihre Acidität verlor. Es hatte sich Schimmelmycel am Boden der Flasche gebildet. Kohlensäure war nicht zugegen. Da bezüglich Belichtung der Lösung nichts angegeben ist, so nehme ich an, daß dieselbe dem diffusen Licht ausgesetzt war.

In der gleichen Zeitschrift teilt Blass[2]) einige Beobachtungen über den gleichen Gegenstand mit. Auch er arbeitete mit der stark verdünnten Lösung von 0,4 zu 1000. Nach einem Jahre reagierte diese nicht mehr sauer und enthielt Pilzflocken, die am Boden der Flasche lagen. Im übrigen war die Flüssigkeit klar geblieben. Die Schimmelbildung war im Verhältnis zu der vom Verf. in anderen organischen Säuren beobachteten so gering, daß er nicht annehmen kann, daß diese geringe Schimmelmenge die Oxalsäure zersetzt resp. aufgezehrt haben könnte. Aus der beigegebenen Abbildung eines mikroskopischen Präparates geht nicht mit Sicherheit hervor, um welchen Pilz es sich gehandelt hat; jedenfalls nicht um Penicillium.

Fleury[3]) fand Oxalsäurelösungen, welche 4—6 dg Säure pro Liter enthielten, nach längerer Zeit unter Bildung einer enormen Menge „kryptogamischer Vegetation“ zersetzt. Eine Lösung von 6,3 g pro Liter blieb unverändert. Verf. ist der Ansicht, daß nur die stark verdünnte Lösung ein Nährmittel für Pilze sei.

In vorstehend erwähnten Arbeiten wurde nur das Vorkommen von Pilzmycelien in wässeriger Oxalsäure erwähnt, ohne daß eigentliche Kulturversuche von Schimmelpilzen in genannter Säure unter analytischer Kontrolle der letzteren vorliegen.

Solche teilt Carl Wehmer[4]) mit. Seiner sehr umfangreichen und interessanten Arbeit entnehme ich die folgenden Angaben, welche sich auf die Zersetzlichkeit wässeriger Oxalsäurelösungen im Lichte und im Dunkeln aufbewahrt beziehen und daher für meine Untersuchung von besonderem Interesse sind.

Verf. erwähnt die Arbeit von O. Warburg, welcher gezeigt hat, daß Pilzdecken, auf Lösungen von freier Oxalsäure gebracht, den Säuregehalt derselben allmählich zerstören.

Wehmer zeigt, daß freie Oxalsäure unter gewissen Bedingungen selbst für widerstandsfähige Pilze ein Gift ist, sobald ihre Konzentration eine gewisse Grenze überschreitet. Setzt man die Konzentration herab, so kann die Säure selbst als Nährstoff (aber als schlechter) z. B. von Penicillium verwertet werden. Aus vergleichenden Versuchen mit Oxalsäurelösungen verschiedener Stärke im Dunkeln und am Lichte zieht Verf. den Schluß, daß eine spontane Säurezersetzung bei Lichtabschluß nicht stattfindet, selbst wenn sich einige Pilzflocken gebildet hatten.

In den belichteten Lösungen war der Säuregehalt merklich heruntergegangen und in mehreren ganz verschwunden. Die Versuchsdauer er-

---

1) Archiv d. Pharmacie. 1873. p. 523.
2) Archiv d. Pharmacie. 1873. p. 310.
3) Ref. Chem. Centralbl. 1883. p. 547.
4) Entstehung und physiologische Bedeutung der Oxalsäure im Stoffwechsel einiger Pilze. (Botan. Zeitung. 1891. No. 15 u. ff.)

streckte sich auf einen Zeitraum von 97 bis 370 Tagen. Die Lösungen standen teils in offenen Kolben, teils waren sie durch Watte verschlossen. Da in einigen der unverschlossenen Gefäße Pilzflocken aufgetreten waren, ein regelmäßiger Unterschied in der Säureabnahme dieser und der steril gebliebenen Lösungen aber nicht bemerkbar war, so schließt Verf., daß dem Lichte bei der Zersetzung der wässerigen Oxalsäurelösung die Hauptwirkung zuzuschreiben ist und die Pilze nur eine nebensächliche Rolle spielen.

Er bemerkt ferner ausdrücklich als eigenartiges Resultat, daß selbst die in Bezug auf Verschluß, Aufbewahrung etc. gleich behandelten Lösungen keine gleichmäßige Veränderung zeigten. Diese Versuche sind ohne Zusatz von Nährflüssigkeit gemacht. Verf. betont jedoch, daß eine Zersetzung der Säure im Stoffwechsel der Pilze wohl möglich ist, wenn noch ein Nährmittel zugegen. Für solche Versuche bezeichnet er Penicillium als am geeignetsten. Bringt man jüngere Decken von genanntem Pilze auf $^1/_2$-proz. Lösungen von Oxalsäure, so ist nach einiger Zeit die Gesamtmenge der Säure verschwunden. Zu bemerken ist, daß bei den erwähnten Versuchen die Lösungen im Dunkeln gehalten wurden. Um widersprechende Angaben in der Litteratur klarzustellen, hat W. P. Jorissen[1]) einige Versuche über Schimmelpilzwirkung auf Oxalsäure-Normallösungen angestellt. Hierbei zeigte sich, daß $^1/_1$-Normaloxalsäure im Dunkeln während 101 Tagen ihren Säuregehalt nicht verminderte (sie wurde etwas stärker), im Lichte dagegen stark an Acidität einbüßte. $^1/_{10}$- und $^1/_{100}$-Normallösung ohne eingeimpfte Pilze hielten sich im Dunkeln 75 Tage lang ebenfalls konstant (der Vergleichsversuch mit belichteten Säuren fehlt). 0,01 Normalsäure mit einem Zusatz von Schimmelpilzen veränderte sich im Dunkeln. Dieser Versuch wurde 2mal angestellt. 1mal verschwand die Säure ganz in 56 Tagen, beim anderen Versuche fand Abnahme der Acidität von ca. $6^1/_2$ Proz. in 75 Tagen statt.

Das Verhalten von 0,1-Normalsäure + Schimmel wurde nicht untersucht. Ebenso sind keine Versuche mit belichteten und zugleich mit Schimmelpilzen beimpften Lösungen erwähnt. Es folgen nun noch solche mit Zusätzen von Hemmungsmitteln zur beimpften Säure. Bei der von Riegler empfohlenen Zugabe von 5 Proz. H_2SO_4 konnte Verf. eine Stabilität der beimpften Lösungen im Dunkeln konstatieren. Dieses Resultat ist zu erwarten gewesen, denn in einer 5-proz. Schwefelsäure dürfte eine Schimmelvegetation wohl ausgeschlossen sein.

Ein Zusatz von 1 Promille Borsäure hielt die Zersetzung von beimpften Lösungen (im Dunkeln) nicht auf.

Eine Lösung, welcher 2 g Borsäure pro Liter zugesetzt war, blieb stabil.

Verf. schließt folgendes aus seinen Versuchen.

Wässerige Oxalsäurelösungen halten sich ohne Schimmel im Dunkeln unverändert; bei Anwesenheit dieser Pilze werden sie zersetzt.

Zusatz von 5 Proz. H_2SO_4 konserviert die Lösungen.

1-promill. Borsäure hat keine Wirkung.

2-promill. Borsäure wirkt nach Jorissen nur in der Kälte konservierend auf Oxalsäurelösungen ein.

---

1) Die Stabilität von Oxalsäurelösungen. (Zeitschr. f. angewandte Chemie. 1899. p. 523.)

Was die Methode der von Jorissen ausgeführten Impfung anbetrifft, so sagt er hierüber folgendes:

„Diese Schimmelpilze waren kultiviert auf frischem Weizen- und Roggenbrot und wurden vorsichtig davon abgehoben, ohne Brot mitzunehmen."

Davon, daß die Schimmelrasen vor der Uebertragung auf die Säure ausgewaschen wurden, ist nichts erwähnt.

Bei dieser Art der Beimpfung ist es aber nicht zu vermeiden, daß kleine Mengen Nährstoffe mit in die zu beimpfende Lösung übergeführt werden; ganz abgesehen davon, daß solche, auf vorzüglichen Nährböden gewachsene Myceldecken eine gewisse Menge Nährmaterial aufgespeichert haben und eine Zeit lang weiter wachsen können. Von Warburg und Wehmer ist aber gezeigt worden, daß die Anwesenheit von Nährstoffen auf die Zerstörung der Oxalsäure durch Schimmelpilze von wesentlichem Einfluß ist. Ich glaubte daher diese Versuche gerade für die im praktischen Gebrauche so wichtige $^1/_{10}$-Normalsäure unter möglichster Ausschließung dieses Einflusses wiederholen zu sollen, um so mehr als derselbe bei der spontanen Infektion der Lösungen in der Praxis eine Mitübertragung von Nährstoffen nicht oder nur in höchst geringem Maße stattfindet. Eine im Laboratorium befindliche Flasche mit $\frac{N}{10}$-Oxalsäurelösung, die längere Zeit nicht benutzt worden war und die im diffusen Lichte gestanden hatte, zeigte sich fast frei von Säure. (10 ccm derselben verbrauchten nur noch 1,6 ccm $^1/_{10}$-N-Natronlauge). Am Boden dieser Flasche lag eine große Menge Mycelflocken.

Von diesem Mycel brachte ich nun in eine mit $^1/_{10}$-N-Oxalsäure (zu $^2/_3$) gefüllte Flasche. Dieselbe war mit Glasstopfen verschlossen. In einer anderen gleichen Flasche hob ich einen Teil der gleichen Lösung zur Kontrolle auf.

Nach 21 Tagen zeigten sich folgende Veränderungen:

Art der Lösung	Verbrauch an $\frac{N}{10}$-Lauge		Veränderung
	am 13. Juni	am 4. Juli	
1) Nicht geimpft	9,952	9,950	0,02 Proz. Säureverlust
2) Geimpft	9,952	9,03	9,3 „ „

Hierauf hob ich die Mycelstücke mittels eines Platindrahtes aus der veränderten Lösung II und brachte sie in bisher steril gewesene Säurelösung. Der Laugenverbrauch für 10 ccm Säure wurde nochmals mit 9,950 ccm bestimmt.

Am 15. Juli, also 12 Tage später, war der Verbrauch an Natronlauge nur noch 9,60 ccm; in Prozenten ausgedrückt, also ein Verlust von 3,5 Proz. zu konstatieren. Ich will bemerken, daß die Lösungen im Halbdunkel standen und niemals von direktem Sonnenlicht getroffen wurden.

Am 28. September prüfte ich wieder mit der gleichen Natronlauge. Es verbrauchten 10 ccm der Säure jetzt nur noch 7,8 ccm Lauge, entsprechend einer Abnahme von $21^1/_2$ Proz., während eine Lösung ohne Schimmel, am gleichen Orte aufbewahrt, nur 3,5 Proz. an Acidität verloren hatte.

Vorstehende Versuche können ihrer geringen Zahl wegen nun selbstverständlich nicht als ausschlaggebend angesehen werden, und setzte ich

daher dieselben in größerem Maßstabe fort. Dabei war ich bestrebt, immer solche Bedingungen einzuhalten, wie sie bei dem natürlichen Auftreten von Schimmelpilzen in Oxalsäurelösungen bestehen.

Ich sah daher darauf, daß bei der Verimpfung nur untergetauchtes Mycel zur Anwendung kam, weil nach meinen eigenen und den mir bekannten Beobachtungen Anderer beim spontanen Auftreten von Mycelium in Oxalsäure niemals auf der Flüssigkeit schwimmend angetroffen wird.

Ferner mußte ein Miteinbringen von fremden Nährstoffen thunlichst ausgeschlossen werden. Weil nun aber die mir zur Verfügung stehende Menge des in Oxalsäurelösung gewachsenen Pilzmateriales für meine ferneren Versuche nicht ausreichte, war ich genötigt, dasselbe durch Kultivierung zu vermehren. Als Nährmaterial wählte ich Bierwürze. Nachdem eine genügende Bildung von Mycel in derselben stattgefunden hatte, nahm ich dieses heraus und züchtete es bei 25° C in $^1/_{10}$-Normaloxalsäure weiter. Letztere ersetzte ich mehrere Male durch neue. Es geschah dies, um die löslichen Nährstoffe aus dem Mycel auszuwaschen und die eventuell in demselben aufgespeicherten Nährstoffe aufbrauchen zu lassen. Erst dann impfte ich mit demselben meine Lösungen.

Was Herstellung und Aufbewahrung der Normallösungen anbetrifft, so bemerke ich, daß dieselben aus einer gereinigien Säure hergestellt wurden. Nach der Auflösung in destilliertem Wasser wurden die Lösungen $^3/_4$—1 Stunde im Dampftopfe 1mal sterilisiert. Alle zur Aufbewahrung dienenden Gefäße wurden vorher im Trockenschranke bei 160° C unter Watteverschluß keimfrei gemacht. Ich will hier bemerken, daß ich bei späteren Versuchen auch die zum Verschlusse dienenden Korke, in Schreibpapier eingewickelt, mitsterilisierte. Stieg die Temperatur nicht erheblich über 160° C, so blieben Korke und Papier unversehrt, ging dieselbe jedoch stark über die angegebene Höhe, so wurden die Korke braun und spröde und brachen dann beim Eindrehen in den Flaschenhals leicht ab.

Zur Titrestellung wurde eine aus Natriumalkoholat und kohlensäurefreiem Wasser bereitete $^1/_{10}$-Normalnatronlauge angewendet. Dieselbe bewahrte ich in einer mit Abfüllvorrichtung und Natronkalkverschluß versehenen Flasche auf, so daß eine spätere Aufnahme von CO_2 durch die Lösung verhindert wurde. Als Indikator diente Phenolphtaleïn. Zur Abmessung der Titreflüssigkeit wurden stets die gleichen Geräte benützt.

In der nachfolgenden Tabelle sind die Ergebnisse der Versuche mit Oxalsäure zusammengestellt.

Die Temperaturen wurden bei A und B mittels Maximal- und Minimalthermometers bestimmt (s. Tabelle p. 660).

Wie aus der vorstehenden Tabelle zu entnehmen ist, haben sich bis auf 3 alle dem Lichte exponierten Lösungen zersetzt. Gleichviel, ob sie vorher sterilisiert waren oder nicht. Es stimmt dies also im großen und ganzen mit den Resultaten überein, die Jorissen und Wehmer erhalten haben. Mit der Beobachtung des erstgenannten Autors deckt sich auch meine Erfahrung, die ich mit in größerer Anzahl im Dunkeln aufbewahrten, geimpften Lösungen gemacht habe. Hier hatte ich eine Stabilität der ungeimpften und sterilen und eine Abnahme des Säuregehaltes bei den mit Schimmelpilzen beimpften Lösungen zu

Veränderung der Oxalsäurelösungen.

Datum des Anfanges und des Endes des Versuches		Beschaffenheit der Lösung	Verbrauch an $\frac{N}{10}$-Lauge in ccm zu Anfang des Versuches	Verbrauch an $\frac{N}{10}$-Lauge in ccm zu Ende des Versuches	Veränderung	Beobachtungszeit in Tagen
A. Lösungen im diffusen Licht am Fenster aufbewahrt. Temperatur 9—16° C.						
4. Okt. 1901	6. Nov. 1901	sterilisiert, nicht geimpft	11,0	10,7	Abnahme v. ca. 3,0 Proz.	33
4. „ 1901	6. „ 1901	desgl.	11,0	10,99	„ „ „ 0,1 „	33
24. „ 1901	18. Dez. 1901	nicht sterilisiert, nicht geimpft	10,1	10,02	„ „ „ 0,8 „	55
20. „ 1901	18. „ 1901	geimpft	10,01	9,11	„ „ „ 9,0 „	59
20. „ 1901	18. „ 1901	nicht geimpft	9,985	9,82	„ „ „ 1,6 „	59
24. „ 1901	18. „ 1901	„ „	10,10	10,1	„ keine	55
24. „ 1901	18. „ 1901	„ „	10,10	10,1	„ „	55
4. Nov. 1901	18. „ 1901	sterilisiert	10,06	10,06	„ „	44
4. „ 1901	18. „ 1901	„	10,07	9,98	„ v. ca. 0,9 „	44
24. Okt. 1901	18. „ 1901	geimpft mit Pilzdecke	9,99	1,06	„ „ „ 89,0 „	55
24. „ 1901	23. Jan. 1902	desgl.	9,99	0,34	„ „ „ 89½ „	91
12. Dez. 1901	14. „ 1902	sterilisiert	9,40	9,31	„ „ „ 96½ „	33
12. „ 1901	14. „ 1902	geimpft	9,38	9,30	„ „ „ 0,8 „	33
12. „ 1901	14. „ 1902	„	9,38	8,13	„ „ „ 12,0 „	33
B. Bei Lichtabschluß aufbewahrt. Temperatur 12—15° C.						
20. Okt. 1901	18. Dez. 1901	geimpft	10,0	9,40	Abnahme v. ca. 6,0 Proz.	59
20. „ 1901	18. „ 1901	„	10,0	9,79	„ „ „ 2,0 „	59
24. „ 1901	18. „ 1901	nicht geimpft, nicht sterilisiert	10,1	10,1	„ keine	55
24. „ 1901	18. „ 1901	sterilisiert	10,12	10,12	„ „	55
1. Nov. 1901	18. „ 1901	nicht sterilisiert nicht geimpft	10,16	10,16	„ „	47
1. „ 1901	18. „ 1901	„ „	10,16	10,155	„ v. ca. 0,05 „	47
4. „ 1901	18. „ 1901	sterilisiert	10,09	10,09	„ keine	44
4. „ 1901	18. „ 1901	„	10,05	10,095	+ 0,45 „	44
12. Dez. 1901	14. Jan. 1902	„	9,40	0,39	„ v. ca. 0,1 „	33
12. „ 1901	14. „ 1902	geimpft	9,38	9,31	„ „ „ 0,7 „	33
12. „ 1901	14. „ 1902	„	9,38	9,21	„ „ „ 1,7 „	33
1. Febr. 1902	22. Juni 1902	sterilisiert	10,795	unveränd.	„ „ „ 0,1 „	132
1. „ 1902	22. „ 1902	„	10,795	unveränd.		
1. „ 1902	22. „ 1902	geimpft (sehr wenig Mycel)	10,60	10,59		
C. Lösungen bei 25° C dunkel aufbewahrt (Brütschrank).						
20. Okt. 1901	18. Dez. 1901	geimpft	10,0	9,57	Abnahme v. ca. 4,3 Proz.	59
20. „ 1901	18. „ 1901	„	9,925	9,51	„ „ „ 4,1 „	59
20. „ 1901	18. „ 1901	nicht geimpft	9,915	10,01	„ keine	59
20. „ 1901	18. „ 1901	„ „	10,0	10,035	„ „	59
1. Nov. 1901	18. „ 1901	„ „	10,16	10,16	„ „	47
1. „ 1901	18. „ 1901	„ „	10,16	10,16	„ „	47
4. „ 1901	18. „ 1901	sterilisiert	10,06	10,06	„ „	44
4. „ 1901	18. „ 1901	„	10,07	10,11	„ „	44
4. „ 1901	18. „ 1901	„	10,05	10,14	„ „	44
12. Dez. 1901	14. Jan. 1902	„	9,395	9,380	„ v. ca. 0,15 „	33
12. „ 1901	14. „ 1902	„	9,40	9,40	„ keine	33
12. „ 1901	14. „ 1902	geimpft	9,38	8,3	„ v. ca. 10,0 „	33
12. „ 1901	14. „ 1902	„	9,38	8,91	„ „ „ 4,7 „	33

verzeichnen. Wie ferner aus der Tabelle hervorgeht, ist bei meinen Versuchen jedoch bei Lichtabschluß die Veränderung eine geringere gewesen.

Einen Unterschied zwischen sterilisierten und nicht sterilisierten Lösungen ohne Schimmel konnte ich nicht bemerken. Im Brütschranke bei einer konstanten Temperatur von 25° C war im allgemeinen eine stärkere Abnahme der Acidität bei den beimpften Lösungen zu verzeichnen. Wenn man erwägt, daß obige Temperatur das Optimum für den zu den Versuchen benützten Schimmelpilz darstellt und außerdem chemische Zersetzungen aller Art bei erhöhter Temperatur schneller verlaufen, so hat dieses Resultat nichts Auffälliges. Faßt man die obigen Resultate zusammen, so ist zu sagen, daß auch bei meinen Versuchen der Lichtwirkung der Hauptanteil bei der Zersetzung zuzuschreiben ist; daß jedoch unter Umständen auch bei Lichtabschluß eine merkbare Zersetzung durch Schimmelpilze stattfinden kann und daß bei höherer Temperatur diese Zersetzung eine stärkere ist.

Natriumthiosulfatlösung.

In der Jodometrie findet das Natriumthiosulfat ausgedehnte Anwendung und zwar meistens als $\frac{n}{10}$-Lösung.

Ueber die geringe Haltbarkeit dieser Titreflüssigkeit sind viele Angaben gemacht worden; die hierzu von verschiedenen Seiten gegebenen Erklärungen übergehe ich, da sie die bakteriologische Seite der Frage nicht berühren.

Es werden Zusätze empfohlen, um die Lösung von unterschwefligsaurem Natron haltbarer zu machen, so z. B. Ammonkarbonat. Nach den Angaben von Prof. Treadwell[1]) ist dieser Zusatz jedoch eher geeignet, die Lösung schneller zersetzlich zu machen.

Nach genanntem Autor verändert sich eine Natriumthiosulfatlösung allerdings in den ersten 8—14 Tagen infolge der Einwirkung von CO_2. Nach dieser Zeit ist jedoch die im destillierten Wasser vorhandene Kohlensäure aufgebraucht und der Titre bleibt konstant. Eine Lösung, deren Jodverbrauch nach 2 Monate langem Stehen pro Kubikcentimeter = 0,011673 g betrug, verbrauchte nach weiteren 8 Monaten 0,011667 g Jod pro Kubikcentimeter. Diese Lösung hatte sich also praktisch nicht verändert.

Bornträger[2]) spricht unter Hinweis auf die Angaben F. Mohr's, welcher schon früher einen Zusatz von Salicylsäure zur Haltbarmachung chemischer Lösungen vorgeschlagen hatte, die Vermutung aus, daß auch der Titre bei Thiosulfatlösung durch Mikroben beeinflußt werden könne. Bornträger setzte zu einer Natriumthiosulfatlösung, deren Stärke jedoch nicht angegeben ist, pro Liter eine Messerspitze voll Salicylsäure.

Während 6 Wochen kontrollierte er alle 2—3 Tage den Titre dieser Lösung mittels Jod, welches er aus 20 ccm Jodkalilösung mit schwefliger Säure und Schwefelsäure frei machte und mit Schwefelkohlenstoff ausschüttelte. Die Konzentration ist bei keiner Lösung angegeben.

Der Verbrauch für diese 20 ccm Jodkalilösung war anfänglich

---

1) Lehrbuch d. analyt. Chemie. Bd. II. p. 429 u. 430.
2) Zeitschr. f. analyt. Chemie. Bd. XXVII. p. 641—642.

11,3 ccm, stieg auf 12,8, fiel wieder auf 11,0 und betrug zuletzt 12,2 ccm. Trotzdem diese Schwankungen bedeutende sind, ist Verf. der Ansicht, daß dieselben hier geringer gewesen seien, als es in Lösungen ohne Zusatz der Fall sei. In der mit Salicylsäure versetzten Lösung hatten sich lange, weiße Fäden ausgeschieden, über deren Natur keine Angaben gemacht werden.

Ich bemerke, daß auf Zusatz der von Bornträger angegebenen und auch von mir angewendeten Salicylsäuremengen zu $^1/_{10}$ N-Natriumthiosulfatlösung eine starke Schwefelausscheidung eintritt. Nach einigen Tagen hat sich jedoch der Niederschlag fest auf den Boden der Flasche angesetzt und ist die Lösung dann klar und kann titriert werden.

Von 2 in Gebrauch befindlichen Thiosulfatlösungen untersuchte ich Proben bakteriologisch und fand in einer Lösung Bacillus fluorescens liquefaciens vor.

Ich dachte daher an die Möglichkeit einer Einwirkung dieser Bakterienart auf obige Lösung und suchte dies durch den Versuch festzustellen. Zu diesem Zwecke verteilte ich $^1/_{10}$ N-Natriumthiosulfatlösung auf 3 Flaschen, sterilisierte im Dampfkochtopfe und beimpfte nach dem Erkalten 2 Flaschen mit Bac. fluor. liquef., indem ich eine geringe Menge einer Agar-Fluorescenskultur überimpfte. Nach 53 Tagen prüfte ich wieder. Es zeigten sich folgende Veränderungen:

Art der Lösung	Ursprüngl. Verbrauch an Thiosulfatlösung	Verbrauch nach 53 Tagen	Veränderung
Beimpft	9,77 ccm	9,74 ccm	+ 0,3 Proz.
Beimpft	9,865 „	9,78 „	+ 0,8½ „
Steril	9,745 „	9,745 „	—

Durch die Plattenmethode konnte ich feststellen, daß beide geimpfte Lösungen Bac. fluor. liquef. enthielten, während die 3. Lösung frei von Bakterien war.

Dieser eine Versuch berechtigt nun noch nicht zu bestimmten Schlüssen und wiederholte ich denselben daher in größerem Maßstabe.

Ich will vorausschicken, daß ich den Titre mit Jod stellte, das aus Jodkaliumlösung mittels Kaliumbichromat in saurer Lösung frei gemacht war. Als Indikator diente Stärkelösung. Das angewandte unterschwefligsaure Natron war frei von schwefliger und Schwefelsäure, das Jodkalium jodsäurefrei.

Zur Lösung verwendete ich kohlensäurefreies, destilliertes Wasser. Der Titre wurde erst einige Tage nach Herstellung der Lösung bestimmt. Zur Beimpfung diente eine geringe Menge einer Agarkultur. Die Thiosulfatlösung befand sich in 16 mit Glasstopfen versehenen $^1/_2$-Literflaschen, die zu $^4/_5$ gefüllt waren. Davon wurden 8 Flaschen durch Kochen im Dampfkochtopfe sterilisiert und die Hälfte von diesen letzteren mit Bacillus fluorescens liquefaciens beimpft; die übrigen steril aufbewahrt. Von den 8 nicht sterilisierten Flaschen wurden 4 mit der früher angegebenen Menge Salicylsäure (1 Messerspitze pro Liter) versetzt und die übrigen ohne weitere Zusätze aufbewahrt.

In Betreff der Temperatur, bei welcher die Aufbewahrung der Lösung erfolgte, ist zu bemerken, daß von den 4 im übrigen gleich be-

handelten Flaschen immer je 2 bei einer Temperatur von 21—23° C, die anderen im Laboratorium in der Nähe des Fensters bei 9—17° C aufgestellt wurden.

Nach 43 Tagen wurde der Jodverbrauch der Lösungen wieder bestimmt. Es war aber kein regelmäßiger Unterschied zwischen den mit Bacillus fluorescens liquefaciens beimpften Lösungen und den steril gebliebenen zu bemerken, indem erstere teilweise konstant geblieben waren, von den sterilen sich aber einige verändert hatten. Bei den mit Salicylsäure versetzten Lösungen war der Jodverbrauch bei den bei Zimmertemperatur aufbewahrten Flaschen etwas zurückgegangen, die Lösung also schwächer geworden. Bei den bei 21—23° C aufbewahrten Lösungen war ein Stärkerwerden zu bemerken. Aus diesen Resultaten geht somit nicht mit Bestimmtheit hervor, daß der Bacillus fluorescens liquefaciens bei der Titreveränderung der Natriumthiosulfatlösung mitwirkte.

Zu den vorstehenden Versuchen benutzte ich das im Laboratorium vorhandene — im großen hergestellte — destillierte Wasser. Es ist jedoch immerhin nicht ausgeschlossen, daß dieses Wasser für so leicht zersetzbare Körper, wie Natriumthiosulfat, nicht rein genug war, indem es Spuren von Säuren oder Fetten enthalten könnte.

Ich setzte deshalb die Versuche unter Berücksichtigung dieser Punkte fort, indem ich die $\frac{n}{10}$-Lösung mit aus Glasgefäßen im Laboratorium destilliertem Wasser bereitete.

Die Lösungen wurden auf 10 absolut reine Glasflaschen verteilt und vor Licht geschützt aufbewahrt, nachdem sie 1 Stunde lang im Dampfe sterilisiert worden waren.

Nach Ablauf von 8 Tagen stellte ich den Titre fest und impfte 6 Flaschen mit Bac. fluor. liquef. 4 Flaschen ließ ich zwecks Kontrolle steril. Hierauf kittete ich die Glasstopfen luftdicht mittels Paraffin zu.

Nach 130 Tagen titrierte ich die Lösungen wieder und konnte ich wiederum keinen Unterschied zwischen den sterilen und geimpften Lösungen finden[1]).

Kulturversuche ergaben in allen beimpften Flaschen das Vorhandensein von Bac. fluor. liquef.

Ich war genötigt, die Versuche mit dieser Lösung vorläufig abzubrechen. Ich möchte noch bemerken, daß in den beimpften Lösungen, in denen eine Veränderung zu bemerken war, diese letztere nicht durch Kohlensäureatmung der eingebrachten Mikroben hervorgebracht sein kann, da ich in diesen Lösungen keine schweflige Säure nachweisen konnte, welche aber bei einer Einwirkung von Kohlensäure hätte entstehen müssen. Es könnte unter Umständen an eine Veränderung durch das jodreduzierende Ferment des Bacillus fluorescens liquefaciens gedacht werden, welches bei der Titration ein Stärkerwerden der Lösung vortäuschen könnte. Da aber die Fermentbildung mit dem Wachstume der Bakterien gleichen Schritt hält und es sich hier des

---

1) Ich will hier bemerken, daß sowohl zur Abmessung der Lösungen als auch zur Titration stets dieselben geaichten Buretten benutzt wurden und in dieser Hinsicht ein Versuchsfehler mir ausgeschlossen erscheint.

spärlichen Nährbodens wegen nur um ein sehr geringes Wachstum handeln kann, so dürfte wohl eine Mitwirkung des Bacillus fluorescens liquefaciens an der Veränderung des Titres von Natriumthiosulfatlösung ausgeschlossen sein und wären die Schwankungen des Titres genannter Lösung in rein chemischen Ursachen zu suchen.

Nur das Eine geht aus meinen Versuchen mit Sicherheit hervor, nämlich daß eingeimpfte Bakterien in $\frac{n}{10}$-Natriumthiosulfatlösungen lange Zeit lebensfähig bleiben können.

Salzsäure.

Ueber das Vorkommen von Schimmel oder Bakterien in $^1/_{10}$-Normalsalzsäure und etwa durch dieselbe hervorgebrachten Veränderungen habe ich keine Angaben in der bakteriologischen Litteratur auffinden können. Ich hatte schon früher Gelegenheit, das Vorkommen von Schimmelmycel in obiger Lösung zu beobachten und zwar war damals eine deutlich sichtbare Menge Schimmel in einer halbgefüllten Literflasche aufgetreten. Als ich im Laufe meiner Arbeit Gelegenheit hatte, eine solche infizierte Salzsäure untersuchen zu können, stellte es sich heraus, daß es sich um eine Form des Penicillium glaucum handelte. In fraglicher Lösung waren 3 Mycelflocken vorhanden. Es zeigte sich, daß jede derselben eine Faser umhüllte, die irgendwie in die Flüssigkeit gelangt war.

Vielleicht hatten diese Fasern dem Schimmel Nährstoff geboten. Im Verhältnis zur Flüssigkeitsmenge war die Mycelmasse äußerst gering. Das früher bestimmte Titre der Lösung hatte sich in ca. 6 Monaten nur äußerst wenig verändert. Da es nun erwiesen war, daß Schimmelmycel in $^1/_{10}$ N-Salzsäure wachsen kann, so suchte ich eine eventuelle Einwirkung auf den Titre diese Säure zu untersuchen. Daß es sich hierbei nicht, wie bei der Oxalsäure, um einen direkten Verbrauch der Säure im Stoffwechsel des Pilzes handeln konnte, ist klar; es wäre aber möglich gewesen, daß letzterer dennoch einen Einfluß auf die Acidität der Lösung hätte ausüben können.

Ich füllte deshalb eine größere Menge $\frac{n}{10}$-Salzsäure in mit Glaspfropfen versehene Flaschen ein. Das lösliche Alkali der Glaswand war hier vollständig entfernt worden.

Zur Titrestellung verwendete ich reine, bis zum konstanten Gewichte geglühte Soda; als Indikator Methylorange.

Zur Impfung konnte ich hier nicht direkt in Säure gewachsenes Pilzmycel benutzen, da das in der $^1/_{10}$ N-Lösung vorgefundene nicht ausreichte. Es wurden daher Kulturen in (resp. auf) Bierwürze angelegt und das erhaltene Mycelium ca. 14 Tage lang in $\frac{n}{10}$ Salzsäure eingelegt, um auch hier die Nährstoffe auszuwaschen. Die Lösung wurde öfters gewechselt.

Dann erst wurde der Schimmel zur Impfung verwendet und nach geschehener Impfung der Titre der Lösungen bestimmt.

Die Flaschen wurden zu $^3/_4$ gefüllt und hierauf mit Paraffin hermetisch verschlossen. Nachdem die Säure ca. 7 Wochen gestanden hatte, bestimmte ich den Titre abermals, doch war keine der Pilzwirkung

zuzuschreibende Veränderung in den geimpften Flüssigkeiten zu bemerken, trotzdem in einem Teile derselben deutliches Wachstum des Schimmels zu konstatieren war. Nirgends war letzterer abgestorben. Diese Versuche zeigen uns also, daß in $\frac{n}{10}$-Salzsäure Schimmelpilze nicht nur längere Zeit lebensfähig bleiben, sondern sogar wachsen können, ohne den Titre merkbar zu beeinflussen.

Ich werde nicht ermangeln, die Lösung nach geraumer Zeit wieder auf solche Veränderungen zu prüfen und möchte mit der vorliegenden Arbeit auch Andere veranlassen, titrierte $\frac{n}{10}$- oder $\frac{n}{100}$-Salzsäuren, in denen Schimmelpilze gefunden werden, auf die Erhaltung des Titres zu prüfen.

Was die Praxis anbetrifft, so wird es vorderhand allerdings das Richtigste sein, deutlich verschimmelte Salzsäurelösungen — wie dies wohl auch bisher jeder sorgfältige Analytiker gethan haben dürfte — zu beseitigen.

Die Resultate aus vorliegender Arbeit lassen sich, wie folgt, zusammenfassen:

I. Durch die Einwirkung gewisser Bakterien kann eine Entfärbung des verdünnten, zur Lunge-Zeckendorff'schen Luftprüfung benutzten Reagenses herbeigeführt werden.

Durch Sterilisation und absolut luftdichten Verschlusse kann selbst der verdünnten Lösung eine für die praktische Verwendung hinreichende Haltbarkeit gegeben werden.

II. Wässerige Oxalsäurelösungen können durch Pilzmycelien selbst im Dunkeln eine Veränderung erleiden.

Sterilisierte, im Dunkeln aufbewahrte Lösungen sind haltbar.

III. Der zuweilen in $\frac{n}{10}$-Natriumthiosulfatlösungen sich vorfindende Bacillus fluorescens liquefaciens hat keinen wesentlichen Einfluß auf die Stabilität des Titres obiger Lösung.

IV. Schimmelpilze vermögen unter Umständen in $\frac{n}{10}$-Salzsäure spärlich weiterzuwachsen. Eine Veränderung des Titres der Säure konnte durch die allerdings nicht abschließenden, in dieser Richtung angestellten Versuche nicht nachgewiesen werden.

Züchtung der Trichophytiepilze in situ.

Antwort auf die Bemerkungen des Herrn Dr. Hollborn in Leipzig.

Von Dr. **H. C. Plaut** in Hamburg.

Die in Bd. XXXI. No. 10 dieser Zeitschrift enthaltenen Bemerkungen von Herrn Dr. Hollborn, in denen er darauf hinweist, daß er ein gleiches Verfahren, wie das von mir Bd. XXXI. No. 5 beschriebene, bereits im Jahre 1895 bei der Untersuchung eines Falles von Alopecia areata in Anwendung gebracht habe, veranlassen mich zu folgender Rückäußerung.

Das von Herrn Dr. Hollborn angewandte Verfahren besitzt nur rein äußerliche Aehnlichkeit mit dem von mir, wie in meiner Arbeit erwähnt, zufällig gefundenen und von mir ausgearbeiteten, weicht aber gerade im Kernpunkt von demselben in evidentester Weise ab, wie man aus seiner Beschreibung deutlich ersehen kann. Dieselbe findet sich nicht an der von Herrn Hollborn citierten Stelle Bd. XVIII. p. 109, sondern in der ersten Mitteilung „Ueber die wahrscheinliche Ursache der Alopecia areata“ Bd. XVII. p. 356. Die ganze Beschreibung der Methode beschränkt sich auf folgenden Satz:

> „Ein anderer Teil der Haare wurde auf einem Objektträger mit etwas Wasser benetzt, in eine feuchte Glaskammer gebracht und täglich unter Erneuerung des von dem Objektträger verdunsteten Wassers einer mikroskopischen Untersuchung unterzogen.“

Der Kernpunkt meines Verfahrens dagegen besteht darin, die Haare oder Schuppen, mit Deckglas überdeckt, ohne jede Kulturflüssigkeit der feuchten Luft auszusetzen und sogar das zufällige Naßwerden des Materials ängstlich zu vermeiden, weil sonst das Ueberwuchern der Mycelien mit fremden Keimen unfehlbar eintritt. In den Schlußbemerkungen sage ich ausdrücklich:

> „Die Kultur darf unter keinen Umständen benäßt werden“

und

> „Bei Oeffnen der Glocke gehe man vorsichtig zu Werke, daß kein Tropfen Wasser an den Rand des Deckgläschens fällt, weil sonst die Kultur unrettbar verloren ist. Die eventuell schon vorhandenen Pilzfäden werden sofort bis zur Unkenntlichkeit entstellt und mit Spaltpilzen überschwemmt. Eine Weiterzucht, ein Abimpfen gelingt dann nicht!“

Das Verfahren des Herrn Hollborn, Haare auf Objektträger zu legen, sie mit Wasser zu benetzen und so ohne jeden Schutz vor Luftverunreinigung in feuchte Kammern zu stellen, schließt so viele Fehlerquellen in sich, daß ich nicht dazu schweigen kann, wenn es einfach mit der von mir ausgearbeiteten Methode identifiziert wird.

Die Resultate, die Herr Hollborn mit seiner Methode gehabt hat, weichen denn auch beträchtlich mit den mit meiner Methode gewonnenen ab, indem ich weder bei Area Celsi (6 Fälle) noch bei Trichorhexis nodosa (3 Fälle) irgend welche Eumyceten herauszüchten konnte, was ja Herrn Hollborn, wie er angiebt, gelungen ist.

Ein Beitrag zur Züchtung des Influenzabacillus.

[Aus dem bakteriologischen Laboratorium der Stadt Cöln a/Rh.]

Von Dr. **Eugen Czaplewski,**

Direktor des bakteriologischen Instituts der Stadt Cöln.

Seit R. Pfeiffer 1893 seine ausführliche Arbeit über die Aetiologie der Influenza[1]) veröffentlichte und im Blutagar ein vorzügliches Mittel zur Züchtung des Influenzabacillus kennen lehrte, hat eine große Zahl von Autoren immer wieder versucht, das Blutagar durch andere einfachere Nährböden zu ersetzen. Eine ausführliche Studie über diesen Gegenstand verdanken wir neuerdings A. Ghon und W. v. Preyss[2]), welche einen resp. zwei neue Ersatznährböden vorschlagen. Alle diese Bestrebungen sind davon ausgegangen, daß der R. Pfeiffer'sche Blutagar etwas umständlich in der Darstellung ist, namentlich, wenn man größere Mengen braucht, dadurch zeitraubend ist und nicht immer ganz gleichmäßig ausfällt. Vergegenwärtigen wir uns, daß der R. Pfeiffersche Blutagar hergestellt wird, indem man einen Tropfen Blut auf die Oberfläche von schräg erstarrtem Agar bringt oder zunächt in dem Kondenswasser des Agarröhrchens verteilt und nach kurzer Zeit mit diesem blutigen Kondenswasser die Agaroberfläche bespült, so ergiebt sich von selbst, daß bei Anlage einer größeren Reihe Röhrchen dies seine Schwierigkeiten hat, weil der von dem Blutspender (meist der Taube) gelieferte Blutstropfen inzwischen an der Einstichstelle gerinnt, so daß man die Verteilung schlecht vornehmen kann und immer wieder neue Einstiche zur Blutgewinnung machen muß. Verunreinigungen können dabei leichter vorkommen und die Taube wird darunter leiden; sie verliert mehr Blut als man gebraucht, ein Teil gerinnt nutzlos. Die gewonnenen Röhrchen wurden zum Nachweis der Sterilität zunächst in den Brutschrank gebracht.

Eine bequeme Modifikation des R. Pfeiffer'schen Verfahrens verdanken wir O. Voges[3]). Er nahm statt Taubenblut menschliches mit dem Schröpfkopf gewonnenes Blut, welches sich bei sterilem Arbeiten in den Schröpfköpfen auf Eis nach ihm wochenlang steril hält. Vor Gebrauch wird dann Blutkuchen mit dem Serum tüchtig durchgeschüttelt und einige Tropfen in eine sterile Petri-Schale gebracht, dazu flüssiges Agar von 100° C hinzugefügt. Nach dem Erstarren hat man einen leicht roten durchsichtigen Nährboden mit glatter Oberfläche. Nach dem Voges'schen Prinzip sind also die roten Blutkörperchen im Nährboden verteilt, während sie beim R. Pfeiffer'schen nur auf der Oberfläche lagen, sodaß bei letzterem also auch nur die Oberfläche für das Influenzabacillenwachstum geeignet war, während beim Voges'schen der Nährboden durch und durch geeignet ist. Der Voges'sche Nährboden ist infolge seiner größeren Gleichmäßigkeit auch für die mikroskopische Untersuchung geeigneter als der R. Pfeiffer'sche, weil bei

1) Zeitschr. f. Hyg. Bd. XIII.
2) Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. XXXII. No. 2. p. 90.
3) Berl. klin. Wochenschr. No. 38. p. 869.

letzterem die noch nicht aufgelösten roten Blutkörperchen störend wirken.

Neu ist dabei auch, daß er heißen Agar von 100° zur Vermischung mit dem Blute nimmt und gerade hiervon eine Förderung des Wachstums anzunehmen scheint. Doch hatte schon R. Pfeiffer (cf. Ztschr. f. Hygiene. Bd. XIII. 1893. p. 364) gefunden, „daß auf Blutagarröhrchen, welche 1 Stunde lang auf 70° erhitzt waren, die Erreger der Grippe noch recht gut fortkommen", und „daß auch das durch Kochen geronnene Hämoglobin eine, wenn auch sehr sparsame, doch merkliche Entwickelung der Influenzastäbchen ermöglicht".

Ein Nachteil des Voges'schen Nährbodens ist der, daß man nicht immer menschliches Schröpfkopfblut zur Hand hat und wohl auch kaum nur zu diesem Zwecke einen Patienten blutig schröpfen wird.

In Anlehnung an dieses Voges'sche Verfahren benutzte dann Grasberger[1]) Pferdeblutkuchen, welche er von dem bei der Diphtherieserumgewinnung abgezapften Pferdeblut als Rückstände erhielt. Er verrieb Teilchen davon mit dem verdächtigen Sputum und strich die Mischung auf der Oberfläche einer vorher erstarrten Agarplatte aus. Auch dies ist ein Material, welches nicht überall zu Gebote steht. Ich habe daher nach einem passenden Ersatz gesucht und unsere in dieser Richtung angestellten Versuche haben uns zur Ausbildung einer Methode geführt, welche sich uns seit längerer Zeit und namentlich bei der letzten hiesigen Influenzaepidemie durchaus bewährt hat und gute Resultate gewährleistet.

Die Methode, wird wie folgt, ausgeführt:

Zur Bereitung des Blutagars bedienen wir uns des Taubenblutes, das R. Pfeiffer seiner Zeit warm empfohlen hat, weil Tauben jederzeit leicht zu beschaffen und das Blut ohne große Umstände bequem keimfrei gewonnen werden kann.

Ein Gehülfe hält die Taube wagerecht, die Brust nach oben, indem er den Zeigefinger der linken Hand von oben zwischen die Füße der Taube steckt und dieselben mit Daumen und Zeigefinger gegendrückt und so herabzieht. Mit der rechten Hand faßt er in gleicher Weise die Flügel, indem er den Zeigefinger der rechten Hand von oben zwischen die Flügel steckt und mit Daumen und Mittelfinger gegendrückt. Die Taube ist dadurch vollkommen immobilisiert.

Mit einer Schere werden sodann die Federn an der Brust ganz kurz, aber ohne Verletzung der zarten Haut abgeschnitten. Man sieht jetzt den starken Brustmuskel durchschimmernd in genügender Ausdehnung freiliegen. Jetzt wird die ganze Brust mit einem mit Alkohol reichlich getränkten Wattebausch gründlich abgerieben[2]).

Unterdessen sind 6—12 Röhrchen oder einige kleine Erlenmeyersche Kölbchen mit Nährböden (Agaragar etc.) im Wasserbad vollkommen flüssig gemacht. Ich benutze hierzu einen kleinen Kupferkessel von 12,5 cm Durchmesser und 15,5 cm Höhe mit einer Siebeinlage. Dann wird die Wassermenge im Wasserbade durch Zusatz ungefähr der gleichen Menge kalten Wassers ca. verdoppelt und dadurch auf ca. 45—60° abgekühlt. Unter dem Wasserbade bleibt die Sparflamme des Landmann'schen Brenners brennen, so daß das geschmolzene Agar etc. flüssig bleibt.

---

1) Zeitschr. f. Hyg. Bd. XXV. 1897. p. 454.
2) Czaplewski, Centralbl. f. Bakt. Bd. XX. 1896.

Sobald nun der Alkohol auf dem freiliegenden Brustmuskel der Taube eben verdunstet ist, picke ich den prallen Brustmuskel mit einer frisch ausgeglühten Impflanzette aus Platiniridium mit schnellem Stiche an. Dieselbe wird sofort aus der Hand gelegt[1]). Auf den scharfen Stich (sollte die Lanzette stumpf werden, so ist sie mit einer Feile und event. dem Schleifstein zu schärfen) perlt meist ein großer Blutstropfen, seltener ein ganzer Strom Blut hervor. Um ihn aufzufangen, verfahre ich in folgender Weise:

In ein steriles Erlenmeyer'sches Kölbchen mit Watteverschluß wird auf den Boden eine Schicht von dem verflüssigten Agar (ca. 10 ccm) gegeben. Dazu kommt das Blut, welches mit einer Art Pipette aufgesogen wird. Als Pipette dient in bequemer Weise die eingeschliffene Pipette eines sogenannten Pipettentropffläschchens, welche mit einem olivenförmigen Saughütchen aus rotem, starkem Gummi armiert wird, da die gewöhnlichen Kautschukhütchen von cylindrischer Form zu schwach ansaugen. Mit dieser Pipette wird soviel Blut wie vor der schnell eintretenden Gerinnung zu gewinnen ist, angesogen und in den verflüssigten Agar im Erlenmeyer'schen Kölbchen entleert, wobei die Pipette durch Ansaugen mit dem Agar ausgespült wird, jedoch unter Vermeidung von Luftblasen. Dann wird der Inhalt des Kölbchens durch vorsichtiges Schwenken sorgfältig durchmischt. Das Kölbchen kommt event. zur Vermeidung von Abkühlung in das warme Wasserbad. Eine Temperatur, welche höher ist als die Gerinnungstemperatur des Eiweißes ist natürlich zu vermeiden, da die Mischung sonst unansehnlich, braun und flockig wird. Durch weiteren Zusatz von flüssigem Agar wird nun die gewünschte Verdünnung des Blutagars hergestellt, welche man bald mit dem Auge an der kaum noch eben rötlichen Farbe erkennen lernt. Durch diese nachfolgende Verdünnung macht man sich größeren oder geringeren Menge des von der Taube in jedem einzelnen von der Falle gewonnenen Blutes unabhängig. Kleine Gerinnsel, welche sich trotz aller Vorsicht häufiger zu bilden pflegen, werden mit einer sterilen Platinöse leicht herausgefischt.

Die Mischung wird sodann in Reagensröhrchen schräg erstrarrt oder zu Platten ausgegossen. Zu Platten benutze ich für Agarmischungen grundsätzlich Petri'sche Schälchen von einem kleineren Durchmesser als gewöhnlich (untere Schale 7 cm Durchmesser). Dadurch wird bei gleichem Inhalt der zum Gießen benutzten Reagenzröhrchen die Schichtdicke größer. Dieselbe soll ca. 3—4 mm betragen, wobei die Durchsichtigkeit bei genügend durchsichtigem Agar noch keinen Mangel zu leiden braucht. Dadurch wird das Austrocknen mehr vermieden und das Wachstum üppiger.

Die gegossenen Blutagarplatten hebe ich unbeimpft (in sterilen Büchsen mit Einsatz) im Eisschrank auf. Vor Gebrauch werden sie getrocknet, indem ich sie kurze Zeit, Deckel und Schale mit der Oeffnung nach abwärts gerichtet, in den Paraffinofen von 50° stelle.

Es erübrigt, noch einige Worte über die Taube und die Pipette zu sagen. Die Blutung der Taube steht meist von selbst sehr schnell und wird event. durch Auflegen von mit Alkohol getränkter Watte gestillt. Wir halten immer 3—4 Tauben für diese Zwecke vorrätig, damit sich die Tiere nach der Blutentnahme zu erholen vermögen.

---

1) Hierzu benutzte ich das von mir angegebene ausziehbare Spritzengestell (zu beziehen von Paul Altmann, Berlin, Louisenstr. Preis 1,50 M.).

Die Pipette wird von dem koagulierten Blute in bequemer Weise gereinigt, indem man sie in ein Erlenmeyer'sches Kölbchen mit 1-proz. Essigsäure stellt und vollgesaugt stehen läßt. Beim Ausspritzen entleeren sich dann die losgeweichten Koagula. Danach bleibt die Pipette bis zum Gebrauch in einem anderen Erlenmeyer'schen Kölbchen mit 10-proz. Natronlauge vollgesaugt stehen und wird kurz vor Gebrauch mit Alkohol und Aether ausgespühlt, danach durch die Flamme gezogen, bis der Aether verdampft ist. Sehr empfehlenswert ist es, die Pipette vor der Abnahme des Blutes mit Glycerin vollzusaugen und wieder auszuspritzen, weil dann die Koagulation des Blutes an der mit Glycerin leicht benetzten Glaswand weniger leicht aufzutreten scheint und die Koagula, wenn sie auftreten, weniger festhaften.

Es ist ganz auffallend, daß trotz dieser scheinbar geringen Vorsichtsmaßregeln kaum jemals eine Verunreinigung des Blutagars vorkommt.

In ähnlicher Weise kann natürlich statt Taubenblut auch anderes Blut verwendet und verdünnt werden, z. B. Kaninchenblut, welches man aus einer durch Abklemmen gestauten Randohrvene durch eine eingestochene Kanüle auffängt, und statt Agaragar Glycerinagar und ähnliche erstarrende Nährböden. Ein ganz besonders üppiges Wachstum der Influenzabacillen habe ich auf Blutagar mit Zusatz von 1-proz. Heyden'schem Nährstoff beobachtet.

Als besonderen Vorzug der Methode betrachte ich den Umstand, daß es auf diese Weise gelingt, größere Serien mit einem gleichmäßigen Nährboden von glatter Oberfläche ohne beim Mikroskopieren störende Beimengung dichterer Ansammlungen von roten Blutkörperchen herzustellen.

Das Wachstum auf den von mir beschriebenen Blutagarnährböden ist sehr üppig, viel üppiger als auf den nach R. Pfeiffer durch Aufstreichen von Blut auf die Oberfläche bereiteten Blutagarröhrchen. Vielleicht spielt hier die geringere Blutkonzentration und größerer Wassergehalt der Nährböden eine Rolle. Wir haben mit diesen Blutagarnährböden so zufriedenstellende Resultate erhalten und die Herstellung derselben ist so bequem und geht so schnell von statten, daß wir nach einem Ersatz vorläufig kein Verlangen tragen. Hérr Dr. Auerbach konnte ferner in unserem Laboratorium feststellen, daß auf nach dieser Methode hergestellter Blutgelatine bez. Blutagar, entgegen den früheren Angaben von R. Pfeiffer u. A., auch bei niederer Temperatur im Gelatinebrütschrank regelmäßig ein kräftiges Wachstum der Influenzabacillen stattfand.

Ueber die Resultate der Influenzauntersuchungen wird demnächst Herr Dr. Auerbach genauere Mitteilungen machen.

Cöln, 12. Sept. 1902.

Zu Thellung's „Experimenteller Beitrag zur Frage der Agglutination der Tuberkelbacillen“ etc.

Von Dr. **von Niessen** in Wiesbaden.

In Bd. XXXII. No. 1 vom 5. Juli 1902 veröffentlicht Fritz Thellung einen „experimentellen Beitrag zur Frage der Agglutination der Tuberkelbacillen und zur Behandlung der Tuberkulose mit Neu-Tuberkulin Koch (Bacillenemulsion)“ aus dem hygienischen Institute der Universität Zürich. Aus den außerordentlich interessanten und praktisch wichtigen Mitteilungen der wertvollen Experimente ersehe ich eine Bestätigung meiner in No. 5 (1902) der Wiener med. Wochenschr. unter dem Titel: „Ein Protest gegen Koch's Tuberkulosierung“ mitgeteilten Versuchsergebnisse der Reinzüchtung von Tuberkelbacillen aus Koch's TR-Präparaten. Es liegt mir nun aus verschiedenen Gründen daran, gegenüber den Angaben Thellung's, meine Arbeit betreffend, ich hätte aus den „zerriebenen Bacillen“ Reinkulturen von Tuberkelbacillen erhalten, festzustellen, daß ich als erster nicht nur in dem Pulver (zerriebene Tuberkelbacillen), sondern gerade in dem zu therapeutischen Zwecken empfohlenen Präparat der „Bacillenemulsion“ lebens- und fortpflanzungsfähige Tuberkelbacillen durch Reinkultur nachgewiesen habe. Hierauf stützt sich ja der „Protest“ in allererster Linie. Meine Arbeit hat, ebenfalls in der Wiener med. Wochenschr. (No. 14. 1902 unter dem Titel: „Ueber das Koch'sche TR und Tuberkelbacillensplitter“), von Karl Spengler-Davos eine Kritik erfahren, die ich darauf meinerseits im gleichen Blatte mit einer „Verteidigung meines Protestes gegen Koch's Tuberkulosierung gegenüber Karl Spengler's Angriffen“ beantwortet habe. — Bei der überaus großen praktischen Bedeutung dieser Tuberkelbacillenbefunde in Koch's TR-Präparaten (in sämtlichen, die ich untersucht habe) halte ich diese Richtigstellung der Thellung'schen Angaben, soweit sie meine Erhebungen bestätigen resp. betreffen, für geboten.

Inhalt.

Frommannsche Buchdruckerei (Hermann Pohle) in Jena.

// CENTRALBLATT
für
Bakteriologie, Parasitenkunde
und Infektionskrankheiten

Erste Abteilung:
Mediz.-hygien. Bakteriologie u. tier. Parasitenkunde

Originale

In Verbindung mit
Geh. Med.-Rat Prof. Dr. Loeffler, Prof. Dr. R. Pfeiffer, Prof. Dr. M. Braun
Greifswald Königsberg i. Pr.
herausgegeben von
Dr. O. Uhlworm in Berlin W., Schaperstr. 2/3 I

Verlag von Gustav Fischer in Jena

XXXII. Band. — Jena, den 5. November 1902. — No. 10.

Preis für den Band (50 Bogen) 15 Mark. Schwierige Tafeln werden einem Bogen gleich gerechnet. — Die Nummern erscheinen zwanglos je nach dem vorliegenden Stoffe. Bei Einzelverkauf Preis für einen einfachen Druckbogen 40 Pfg., für eine Tafel 60 Pfg.

Hierzu als regelmäßige Beilage die Inhaltsübersichten der II. Abteilung des Centralblattes.

Die Redaktion des „Centralblatts für Bakteriologie und Parasitenkunde“ richtet an die Herren Mitarbeiter die ergebene Bitte, etwaige Wünsche um Lieferung von besonderen Abdrücken ihrer Aufsätze entweder bei der Einsendung der Abhandlungen an die Redaktion auf das Manuskript schreiben zu wollen oder spätestens nach Empfang der ersten Korrekturabzüge direkt an den Verleger, Herrn Gustav Fischer in Jena, gelangen zu lassen.

Original-Mitteilungen.

Ueber ein dem Pestbacillus ähnliches Bakterium: Bacterium Bristolense.

Von **E. Klein** in London.

Mit 3 Figuren.

Auf einem Frachtdampfer, der von der Küste Kleinasiens in Bristol angelangt war, wurde beim Ausladen eine Anzahl toter Ratten vorgefunden. Da Kleinasien ein mit Pest behaftetes Land ist, so war der Verdacht gerechtfertigt, daß die Ratten an der Pest eingegangen waren. Unter dem Schiffspersonale war kein Krankheitsfall irgend welcher Art vorgekommen.

Die toten Ratten wurden auf Pest bakterioskopisch untersucht, doch konnten keine Pestbacillen weder durch das Kulturverfahren noch durch das Tierexperiment nachgewiesen werden; es wurde hingegen als der

Krankheitserreger ein Mikrobe gefunden, der in kultureller Beziehung zwischen Bacillus coli und Bacterium lactis aërogenes steht und für den ich seiner Herkunft wegen den Namen Bacterium Bristolense vorschlage.

Die Sektion der toten Schiffsratten ergab folgenden Zustand: Beide Lungen waren stark hyperämisch, viele Läppchen zeigten Hepatisation; die Milz war vergrößert, weich und hyperämisch; der Darm — hauptsächlich der Dünndarm — war stark hyperämisch, relaxiert und enthielt blutigen Schleim; die Lymphdrüsen waren nicht vergrößert.

Plattenkulturen wurden mit dem Safte der entzündeten Lungenpartieen und dem Milzsafte angelegt, sowie Meerschweinschen und Ratten kutan und subkutan infiziert.



Fig. 1. Kultur des B. Bristolense auf alter Kartoffel. Vergrößerung 1 : 4.

Auf den Platten sowohl des Lungen- als auch des Milzsaftes entwickelten sich rasch und in großer Anzahl, und bei weitem die der Kokken überwiegend, Kolonieen einer und derselben Species von unbeweglichen, ovalen bis cylindrischen Stäbchen, die in getrockneten und gefärbten Präparaten dem Pestbacillus in der Länge und in der ausgesprochenen Polfärbung sowie in der negativen Gram-Färbung sehr ähnlich waren; doch waren die Stäbchen entschieden dicker als die der Pest. Nach Abimpfungen in der Gelatine, Agar, Bouillon, Milch, Kartoffel, sowohl in Oberflächen-, Schüttel- als auch Tiefenkulturen, zeigte der Mikrobe fast alle Charaktere des typischen Bacillus coli, mit Ausnahme daß die Milch unverändert und flüssig blieb; Neutralrotkultur war positiv; Indol bildete er deutlich. Auf der Kartoffel war das Wachstum von dem des B. coli verschieden und mit dem des Bacterium lactis aërogenes identisch, nämlich: auf alter Kartoffel bildet er in wenigen Tagen eine erhabene, weißliche, saftige Auflagerung, in der rasch zahlreiche Gasblasen sich entwickeln (siehe Fig. 1).

Der Mikrobe ist virulent für Meerschweinchen, weiße Ratten und Mäuse; Kaninchen zeigen sich refraktär. Bei mäßigen Dosen der Kultur ist die subkutane und intraperitoneale Injektion tödlich, die kutane — d. h. Einreibung in die oberflächlich skarifizierte Cutis — ist ohne Wirkung.

Bei der intraperitonealen Injektion der Meerschweinchen wirken selbst kleine Dosen tödlich binnen 24 Stunden. Bei der Sektion zeigt sich der Darm stark entzündet, in der Peritonealhöhle ist graues viscides Exsudat, das wenige Leukocyten enthält, jedoch mit den Bacillen dicht erfüllt ist; in den nach den üblichen Methoden gefärbten Präparaten ist wegen der ausgesprochenen Polfärbung der Bacillen eine Verwechselung mit Pestbacillen denkbar (s. Fig. 2). Im Blute dieser Tiere sind die Bacillen ebenfalls sehr reichlich vorhanden.

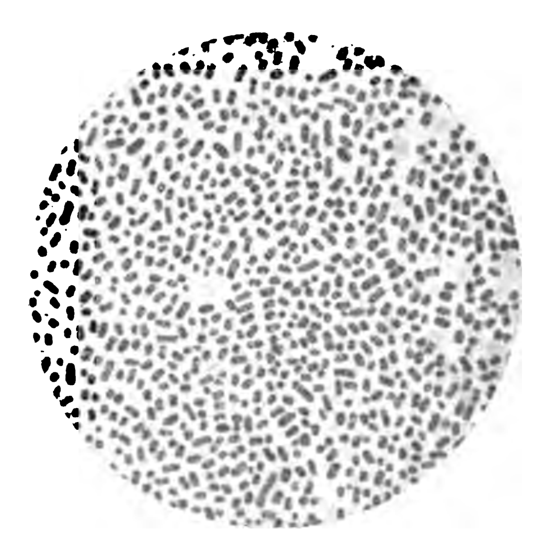


Fig. 2. Peritoneales Exsudat einer subkutan infizierten Ratte. Vergrößerung 1 : 1000.

Nach der subkutanen Injektion von Kultur tritt der Tod der meisten Tiere (Meerschweinchen und Ratten) in wenigen Tagen ein; bei der Sektion finden sich die Lymphdrüsen der Injektionsgegend sehr angeschwollen; die Milz ist vergrößert, das Peritoneum entzündet, die Lungen sind stark hyperämisch und zeigen lobuläre Entzündung. Sowohl die Milz als auch die geschwellten Lymphdrüsen enthalten die polar färbbaren Bacillen sehr reichlich, und ist namentlich das Bild der gefärbten Aufstrichpräparate der Milz dem der Pestbacillen zum Verwechseln ähnlich, wie die abgebildete Figur 3 zeigt. Die Kultur lehrt jedoch bald, daß eine Verwechselung der beiden Mikroben nicht möglich ist. Mäuse gehen nach subkutaner Injektion in 30 bis 48 Stunden ein; sie zeigen Oedem an der Injektionsstelle und finden sich hier die pol-färbbaren Bacillen reichlich, doch sind sie entschieden dicker als die Pestbacillen; die Milz ist vergrößert, sowohl der Milzsaft als auch das Herzblut enthalten die Mikroben.



Fig. 3. Milzsaft eines nach subkutaner Infektion eingegangenen Meerschweinchens. Vergr. 1 : 1000.

Nachdruck verboten.

A case of extensive necrosis of the bones of the skull and face with pus formation produced by hitherto undescribed microorganisms.

[From the Laboratories of Pathology and Bacteriology, College of Physicians and Surgeons, Atlanta, Ga.]

By **H. F. Harris**, M.D., Atlanta, Ga.

With 1 figure.

The case the report of which follows is one of unusual interest both on account of the clinical course of the disease and also for the reason that it appears to be produced by microorganisms which have not hitherto been described:

M. O., aged 46, a German Jew, merchant, was first seen in December, 1901.

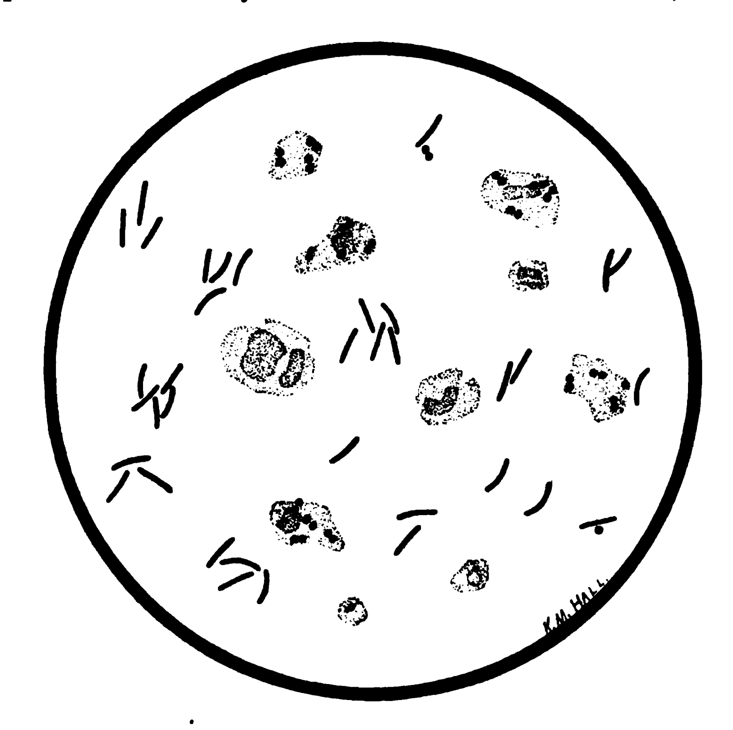
The patient's family and person history were negative.

On March 11, 1893, while living in Florida, he struck his head against the edge of a mantel, the injury following which was, however, not very severe. About a month later he noticed that there was slight swelling in the region that had been bruised. The enlargement in the affected area increased, and ultimately pus was discharged through the openings in the skin. Although he denied having had syphilis his physician prescribed iodide of potassium with much benefit. He discontinued the use of this drug, and some months later the trouble reappeared. He then went to Mt. Sinai Hospital in New York where he was again treated with iodide of potassium, and as a result was apparently entirely cured. In about a year the trouble reoccurred, and his physician made an incision and removed more or less of the diseased bone. Since this time he has had seven operations at intervals of about a year, following each of which he somewhat improved, but never entirely recovered. The trouble has extended from its original site in the frontal bone backward on the right side to the occiput. In the area affected the bone is entirely mecrosed, and has either disintegrated or has been removed, with the result that the skull is frightfully deformed, there being in the right frontal region a depression which would almost contain the fist of an adult. The disease has also extended down into the bones of the face, and he has open sinuses that constantly discharge pus into the mouth, and at several places on the skin of the face. He was last operated upon by Dr. W. P. Nicholson, of Atlanta, who removed a portion of the frontal bone, both nasal bones and the malar bone, zygoma and superior maxillary of the right side. Before this operation was performed the patient was quite weak, his pulse being always above 100 and sometimes reaching as high as 140, his respiration was hurried, being 24—28 to the minute, and the temperature was somewhat elevated, on the day of admission being as high as 102° F. On account of the fact that the necrotic process involved some of the nerves of the face he complained of agonizing pain in the affected region.

The pus that was discharged from the sinuses was of a light yellowish color, and had an unusually disagreeable and penetrating

odor. On microscopic examination this discharge is found to resemble ordinary pus, it being composed almost entirely of a fluid in which there are multitudes of polymorphonuclear leucocytes in suspension. The pus was dried on cover slips and stained by the usual methods for bacteria, and much to my astonishment none of the common organisms of suppuration were detected, but there were found lying free between the pus cells here and there bacilli, and within many of the cells numerous diplococci were encountered. Both of these organisms stained by all of the usual methods, and were very prettily colored by both the methods of Gram and Claudius.

The cocci are rarely found except within the pus corpuscles, but when present at all always occur in considerable number; as a rule



there are a dozen or more pairs of the cocci within a single cell, but quite often the number is considerably greater, they appearing in many cases to completely fill the cell. Occasionally they are found in small collections lying entirely free, but this is rather exceptional. The organisms always occur as diplococci; they do not form chains, nor do they ever appear as tetracocci. The individual elements are round and measure from 0,3—0,4 μ in diameter. The two cocci are always separated from each other by a clear interval of about 0,2 μ in width. When the pair are measured they are therefore from 0,8—1 μ in length, and 0,3—0,4 μ in diameter. No capsule was ever demonstrated around them.

The bacilli before referred to are not present in such numbers as the cocci. They vary in length from 3—8 μ, and in diameter from 0,3—0,4 μ. The bacilli are oftentimes straight, but more frequently are

slightly curved; not uncommonly they taper toward either end, so much so that their diameter is decidedly less in these situations than nearer the central portions of the organisms. The usually occur in groups of two or three, but are never attached to each other. Their ends are rounded.

Attempts were made to cultivate these organisms on all of the media ordinarily employed for such purposes, but I only succeeded in growing the bacilli to a limited extent in a few instances; there was never the slightest indication of development of the cocci. The media employed comprised bouillon, plain agar, glycerine agar, glucose agar, gelatine, potato, and both animal and human blood serum. The media were brought to the proper degree of alkalinity according to the directions of the Committee of Bacteriologists of the American Public Health Association. In stab cultures the bacilli grew to a slight extent in glucose agar, producing along the tract of the needle a faint whitish film, and causing the production of much gas. After two or three inoculations the bacilli invariably died. On human blood serum slight surface cultures could also be produced in the presence of hydrogen, but never when the medium was exposed to the air. The bacilli do not show when artificially grown precisely the characteristics that they do when obtained from fresh pus. Their average length is considerably greater and they are quite irregular in form. In culture they have a tendency to form small ball-like masses of bacilli; this is probably the result of branching which is clearly perceptible in many instances. It would therefore appear that this organism is in reality a streptothrix. It is to be regretted that these bacteria could not be so cultivated that satisfactory studies of them could be carried out. Under the impression that they might possibly develop in some of the lower animals, I have injected the pus into mice, guinea pigs, rabbits and dogs. These injections were made subcutaneously, and also into the peritoneal cavity, but they were followed by absolutely no ill effects, and when the animals were killed months after the regions into which the injections were made were found entirely normal. I also made openings into the cranial bones of a guinea pig, a rabbit and a dog, and introduced some of the pus, but in no instance did a lesion develop as a consequence. The coccus herein described resembles that of croupous pneumonia, while the bacillus is related to Fraenkel's bacillus phlegmone emphysematose and to the organisms that cause malignant edema and symptomatic anthrax.

Shortly after seeing this man, Dr. W. F. Westmoreland, through whose kindness I first saw him, removed a small fragment of the diseased bone for me for examination, and Dr. W. P. Nicholson, when he made the last operation, was good enough to turn over to me the removed structures for a like purpose. These specimens were fixed in Bensley's solution, decalcified with nitric acid, subsequently embedded in paraffine, and stained by all of the usual methods employed in pathologic and bacteriologic investigation.

On microscopic examination of these tissues the bone substance in the diseased area is found to be in a necrotic condition, and in almost all cases the lacunae are entirely empty. The canaliculi passing off from them seemed in many instances to be occluded and cannot be made out even on most careful examination. The bone lamellae are usually greatly thinned, and at their free surfaces exhibit a ragged,

irregular border obviously resulting from the disintegration of the tissues composing them. The structures normally found in the Haversian canals have entirely disappeared in the regions affected-their places being occupied by an acidophilic granular debris in which there are myriads of the bacteria before described. The cocci greatly exceed the bacilli in number.

Passing to the edge of the area most diseased it is found that the granular material and bacteria suddenly give way to enormous masses of polymorphonuclear leucocytes, and, frequently, considerable collections of red-blood cells. In this area there are a great many pus cells containing aggregations of cocci. As the surrounding normal bone is approached the polymorphonuclear leucocytes and red cells become fewer and fewer so that within a very short distance from the zone of greatest change practically none of those cells are encountered. In this area the perivascular lymph spaces contain in addition to an occasional polymorphonuclear leucocyte a few lymphoid and plasma cells. The bone corpuscles of the lamellae have disappeared considerably beyond the region most affected — this change, indeed, extending outward until the Haversian canals become entirely normal. From what has been said it is seen that the pathologic alterations is markedly circumscribed and that a cure would in all probability result if all the diseased bone could be removed.

It is noteworthy that the soft tissues adjoining the necrosed bone do not contain either of the bacteria herein described, though they are filled with multitudes of polymorphonuclear leucocytes, and frequently rather large areas of haemorrhage are found. These tissues also have within them many lymphoid and plasma cells.

From the constant association of the bacteria with the lesions found there can be no reasonable doubt that they stand in a causative relation to them.

Ueber eine von einem atypischen Colibacillus veranlasste typhusähnliche Hausepidemie hydrischen Ursprunges.

[Aus dem hygienischen Laboratorium an der Universität zu Jassy.]

Von

a. o. Prof. **V. Sion**, Direktor des Laboratoriums, und Prof. **V. Negel**, Primärarzt.

(Schluß.)

Wir züchteten unsere Bakterien auf der sogenannten Piorkowskischen Gelatine. Nach unseren Untersuchungen, die übrigens mit den Beobachtungen derjenigen übereinstimmen, die in denselben Richtungen arbeiteten, sind die durch diese Methode erzielten Resultate — die wichtig sind für die Differenzierung der Typhus- und Coli-Bacillen in jenen Fällen, in welchen die betreffenden Mikroorganismen gleichzeitig eine Reihe anderer positiver Charaktere bieten — für sich genommen, von keinem größeren Werte als die übrigen Differenzierungsmittel. Im Gegenteile, uns scheint es, daß dieses Unterscheidungsmittel nicht zu den wertvollsten gehört. Es unterliegt keinem Zweifel, daß die Flagel-

latenkolonieen eine Eigenschaft des Typhusbacillus bilden. Was aber deren Wert als Differenzierungsmerkmal herabsetzt, ist das, daß sie nicht eine ausschließliche Erscheinung der Typhusbacillen sind. So haben wir unter unseren 58 Coli-Testobjekten 6 Stämme, die auf Piorkowski'scher Gelatine Flagellatenkolonieen bilden. Es ist wahr, daß deren Zahl geringer ist als beim Typhusbacillus, allein deren Vorhandensein ist ausreichend, um gegebenenfalls getäuscht werden zu können. Auch bemerken wir, daß wir in unserer Kontrolle die vom Autor aufgestellten Bedingungen, betreffend die Alkalinität und Intensität des Harns, die Konzentration der Gelatine, die Temperatur, die Dichtigkeit der Kolonieen auf der Platte etc. in strengster Weise erfüllt haben. Andererseits sind die Flagellatenkolonieen selbst für den Typhusbacillus nicht ein so absoluter Charakter, wie z. B. das Fehlen der Zuckergärung. Bei keinem unserer Typhusbakterien waren auf Piorkowskischer Gelatine sämtliche Kolonieen mit Flagellen versehen. Von diesen waren 4, die meistens Flagellatenkolonieen boten; allein ein geringer Teil, etwa der 5. oder 6. Teil, sind nur dadurch von den Coli-Kolonieen zu unterscheiden, daß sie durchsichtiger sind und daß ihnen die leicht gelbliche Färbung abgeht, sowie dadurch, daß sie manchmal eine schwach opalisierende Aureole bieten. Bei den übrigen 2 Typhusstämmen sind die nicht flagellierten Kolonieen zahlreicher und unterscheiden sich von diesem Standpunkte aus nicht von einem äußerst beweglichen Coli S_1 No. 36, gezüchtet aus dem Stuhle eines der beiden gesunden Verff. — ein Coli, das die Milch nicht koaguliert und auf Piorkowski'scher Gelatine eine ziemlich große Anzahl typischer Flagellatenkolonieen bildet.

Wir hätten noch zu bemerken, daß wir uns von der Wichtigkeit des Harns in der Piorkowski'schen Nährsubstanz nicht überzeugen konnten. Wir sind, mit anderen Verff.'n übereinstimmend, viel eher der Ansicht, daß die Beweglichkeit des Bakteriums und die schwache Konzentration der Gelatine die ausschließlichen Faktoren sind, die den Charakter der Flagellierung der Kolonieen veranlassen. Wir bekräftigen diese unsere Annahme durch einen von uns angestellten Vergleich über das Wachstum der verschiedenen Typhus- und Coli-Stämme auf Piorkowski'scher Gelatine und andererseits auf einer Gelatine in der Konzentration von 3,3 Proz., wie sie Piorkowski vorschreibt, der aber statt Harn die gewöhnliche Bouillon als Basis dient. Es ist bekannt, daß vor Piorkowski Rosenthal[1]) und Klie[2]) unter solchen Verhältnissen ebensolche Kolonieen beobachteten wie Piorkowski in der Harngelatine. Es ist wahr, daß diese Autoren nicht von Flagellatenkolonieen sprachen, eine Bezeichnung, die von Piorkowski herrührt. Indem wir vergleichend, wie erwähnt, Coli und Typhus auf diesen beiden Gelatinearten züchteten, konnten wir keine sichtbaren Unterschiede bemerken. Diejenigen Bakterien, die imstande sind, Flagellatenkolonieen zu bilden, thun es in beiden Nährmedien, ohne Unterschied in deren Form und Anzahl. Diejenigen aber, die auf der Nährsubstanz Rosenthal's und Klie's keine Flagellatenkolonieen bilden, thun es auch nicht auf dem Piorkowski'schen Nähr-

---

1) Rosenthal, Beobachtungen über die Variabilität der Bakterienverbände und der Kolonieformen unter verschiedenen physikalischen Bedingungen. (Deutsch. Arch. f. klin. Med. 1895.)

2) Klie, Untersuchung des Wachstums von Bacillus typhi abdominalis und Bacillus coli commune etc. (Centralbl. f. Bakt. etc. Abt. I. Bd. XX.)

medium. Die Unnötigkeit des Harns ist bereits durch den oben erwähnten Grundbeweis bezeugt, daß es kein Typhusexemplar giebt, das ausschließlich Flagellatenkolonieen bildet und nicht nebenbei auch noch flagellose Kolonieen. Es könnte dies nicht erklärt werden, wenn die Flagellatenbildung von der Anwesenheit des Harnes abhängen würde. Wohl erklärt dies sich aber, wenn neben der schwachen Konzentration des Nährmediums dieselbe mit der Beweglichkeit des Bakteriums in Beziehung gebracht wird. So wissen wir, daß bei den beweglichsten Typhusstämmen nicht alle Individuen stets denselben Mobilitätsgrad zeigen, sondern daß neben den zum größten Teile stark beweglichen Bakterien auch solche vorhanden sind, deren Beweglichkeit bedeutend geringer ist, selbst in kaum entwickelten Kulturen. Diesen letzteren, schwach beweglichen Individuen sind wohl die nicht flagellierten Kolonieen zu verdanken, die unseres Wissens in bestimmter Anzahl bei jedem Typhusbacillus zu beobachten sind.

Trotz dieser Beschränkungen, die wir für den Wert dieses Verfahrens aufgestellt haben, verwendeten wir es beim Studium unserer Epidemiebakterien. Selbstverständlich verwendeten wir die Harngelatine und die von Piorkowski aufgestellten Bedingungen und nicht die Gelatine Rosenthal-Klie's. Auf dieser Nährsubstanz bildeten die Bakterien No. 1, N. J. und No. 2, N. J. kleine, tiefe, durchsichtige, mit unbewaffnetem Auge gesehen, farblos scheinende Kolonieen, die aber unter dem Mikroskope, insbesondere nach einigen Tagen, einen leichten gelblich-grünen Reflex bilden. Sie sind manchmal rund, zumeist aber oval und scharf umrändert. Etwa 1 : 15 bilden flagellenförmige Verlängerungen, wie sie von Piorkowski beim Typhusbacillus beschrieben worden sind. Es verlohnt sich, eine Eigenschaft zu erwähnen, der wir bei einer großen Anzahl der oberflächlichen Kolonieen begegneten. Es ist dies ein feines Häutchen, durchsichtig, farblos, wasserhell, sowohl mit unbewaffnetem Auge wie unter dem Mikroskope. Es ist nie größer als 3—4 mm im Durchmesser, fein gestreift, als ob er von parallel gereihten Fäden gebildet wäre. Die Wirklichkeit dieser letzteren Gestaltung ist durch gefärbte Klatschpräparate zu bezeugen, wo die Kolonie als von einer Anzahl geknickter Fäden, deren Schleifen sich häufen und parallel aneinander reihen, gebildet erscheint. Es sind dies weiter nichts als ununterbrochene Fäden von kettenförmig aneinander gereihten Bakterien, ohne daß zwischen denselben eine besondere Verbindung stattfindet, indem in den nach gewöhnlicher Art gefärbten Präparaten dieselben voneinander gesondert angetroffen werden. Die Ränder dieser Kolonieen senden mehrere Ausläufer aus. Es ist aber ein wesentlicher Unterschied vorhanden zwischen diesen Ausläufern und den Flagellen der Piorkowski'schen Kolonieen. Erstens ist deren Zahl verschieden, sie sind niemals so zahlreich, wie bei den Piorkowski schen Kolonieen; gewöhnlich trifft man 2—3, selten 4—5; sie sind nicht wie jene fein, fadenförmig, gewellt und oft verflochten; außerdem sind sie kürzer, manchmal sind sie so lang wie der Durchmesser der Kolonie, ein anderes Mal sind sie kürzer; auf jeden Fall setzen sie sich in die Kolonie durch eine breite Basis fort. Diese Verhältnisse können nicht besser wiedergegeben werden als durch den Vergleich mit dem, was zwischen der Nervenzelle und deren protoplasmatischem Ausläufer vorhanden ist. Je weiter sie sich vom Rande der Kolonie entfernen, um so schmäler werden diese Ausläufer. Trotzdem aber sind sie selbst an ihrem freien Ende 3—4mal dicker als die Fäden der Piorkowski-

schen Kolonieen und enden hier stumpf. An ihrem Verlaufe bemerkt man dieselben Strichelungen wie an dem Körper der Kolonie, die, wie auf den Klatschpräparaten sichtbar ist, eine Fortsetzung der eigentlichen Koloniestrichelungen sind.

Wenn es uns gelungen ist, genau das, was wir gesehen haben, zu beschreiben, so glauben wir, daß für Jeden der Unterschied zwischen unseren und den Piorkowski'schen Kolonieen erkenntlich ist. Indem wir den Gedanken dieses Forschers verfolgten, verglichen wir unsere Kolonieen mit Amöben und nannten dieselben „amöbenförmige Kolonieen“. Der einzige Unterschied, den unsere Bakterien untereinander von diesem Standpunkte aus bieten, ist nur quantitativ. So liefern die Bakterien No. 4. G. R. und No. 5, V. R. zahlreichere amöbenförmige Kolonieen als No. 1 und No. 2, während sie bei No. 3, N. R. und No. 6, Ap. selten sind. Bei allen sind die flagellaten Kolonieen in geringer Anzahl und bei No. 6, Ap. auch noch undeutlich vorhanden.

Um unsere Epidemiebakterien in genauer Weise zu charakterisieren, sehen wir uns veranlaßt, auch deren Verhalten auf Kartoffeln zu würdigen. Wir gehen nicht näher ein auf den Einfluß der chemischen Zusammensetzung der Kartoffel auf das Aussehen der Kulturen der 2 Bakterien, des Typhus und Coli. Allein wir glauben, daß, wenn im allgemeinen die Natur der Kartoffel es ist, die das Aussehen der Kultur verändert, doch auch die verborgenen Eigenschaften der Bakterien in dieser Hinsicht von Bedeutung sein müssen. Wir müssen nämlich annehmen, daß Coli-Typen vorhanden sind, die nie das klassische Bild der Kartoffelkultur bieten. Derartige Typen müssen wohl selten sein, allein sie existieren sicherlich, denn wir besitzen einen Coli, isoliert aus dem Stuhle eines Typhuskranken, neben einem Typhusbacillus, den wir in Anbetracht seines Verhaltens auf der Kartoffel ursprünglich als Eberth-schen Bacillus ansahen. Auf verschiedenen Kartoffelarten gezüchtet, waren dessen Kolonieen nie hervorragend, durchaus farblos; nur die Kartoffel war feuchter und glänzender, genau wie bei Typhus. Erst nachdem wir bemerkten, daß er Glukose in Gärung versetzte und daß er stark indolerzeugend ist — er liefert die schönste und intensivste rotviolette Färbung unter sämtlichen unserer Coli-Stämme — haben wir ihn unserer Coli-Sammlung unter der Bezeichnung Coli No. 18, J s. einverleiht.

Auf Scheiben von einer und derselben Kartoffel, die in Petri-Schalen sterilisiert waren, boten unsere 6 Typhusstämme und sämtliche Coli-Stämme — mit Ausnahme von No. 18, Js. — typische Kulturen. Auf denselben Scheiben bildeten die Bakterien unserer Epidemie eine Schicht, die wohl vom Typhus wie vom Coli verschieden ist. So bildeten die Bakterien No. 1, N. J. und No. 2, N. J. nicht die geringste Hervorragung. Die Oberfläche der Kartoffel, woselbst sich die Bakterien entwickelten, unterscheidet sich von der Umgebung nur durch die Aenderung der Farbe, die schwach braungelblich wird; das Aussehen ist aber nicht feucht und glänzend, sondern trocken, glanzlos, undurchsichtig, sehr fein gekörnt, wie pergamentiert. Diese beiden Bakterien boten dieses Aussehen auf sämtlichen Kartoffeln, auf welchen sie gezüchtet wurden. Das Bakterium No. 3, N. R. wächst in durchaus ähnlicher Weise: Dieselbe trockene, pergamentierte, gekörnte, relieflose Schicht; der einzige Unterschied besteht darin, daß anstatt braun dieselbe grau ist. Die Bakterien No. 4, V. R. und No. 5, G. R. wuchsen

manchmal wie No. 1 und No. 2, ein anderes Mal wie No. 3. Allein das Bakterium No. 6, Ap. ändert einigermaßen die Art seines Wachstums, indem es sich mehr dem Coli nähert; es bildet eine feuchtere Schicht, glänzender, einförmiger, hervorragender, trotzdem aber niemals so reichlich wie beim Coli.

Im Milchserum Petruschky's mittels blauer Lackmustinktur gefärbt, entwickeln sich unsere sämtlichen Epidemiebakterien recht gut und verleihen der Nährsubstanz wechselnde alkalische Reaktion. So war der Grad dieser Alkalinität bestimmt mit einer $^1/_{10}$ normalen Salzsäurelösung, von 2,5 Proz. bei den Bakterien No. 1, N. J. und No. 2, N. J., von 1 Proz. bei dem Bakterium No. 6, Ap. und von 1,5 Proz. bei den Bakterien No. 3, N. R., No. 4, G. R. und No. 5, V. R. Gleichzeitig geben sämtliche Mikrobien dem Serum eine dunkelblaue, ins Violette spielende Färbung. Diese Eigenschaft unserer Bakterien erklärt uns die Art, wie sie sich in der Milch verhalten. Nichts ist natürlicher, als daß diese alkalibildenden Bakterien die Milch nicht gerinnen machen. Hierdurch gleichen sie den Mikroorganismen No. 5, 6 und 7 Schottmüller's[1]). Die geringere Alkalinität unserer Bakterien, im Vergleich zu denen dieses Autors, erklären uns vielleicht den Grund, warum wir nicht, wie dieser, die nachherige Klärung der Milch beobachtet haben. Wahrscheinlich war die Menge des von unseren Bakterien erzeugten Alkali nicht ausreichend, um das Caseïn von neuem zu lösen. Trotzdem bleibt uns die zweite Erscheinung, die eigentümliche sirupartige Verdickung der Milch bei unseren Bakterien, wiederkehrend, wie gesagt, nur beim Bakterium C_{12} Sternberg's unerklärlich.

Wir sind nicht imstande, eine ebensolche bestimmte Ansicht über ein anderes Nährmedium Capaldi und Proskauer's[2]) — es ist dies die zur Differenzierung von Coli und Typhus von ihnen empfohlene mineralische Nährsubstanz, der etwas Asparagin hinzugefügt wird — wie über das mannithaltige zu äußern. Nach den Beobachtungen dieser Autoren soll Coli stets auf diesem Nährmedium gedeihen, Typhus aber nie. Wenn auch in der Mehrzahl der Fälle die Verhältnisse sich derartig verhalten, so sind doch Ausnahmen vorhanden. So züchtete Radziewski, der Einzige, der diese Nährsubstanz vor uns nachprüfte, 2 Coli aus 2 Cystitisfällen, die sich ebenso wie Typhus verhielten, d. h. sie gedeihen nicht auf der mineralischen Nährsubstanz Capaldi-Proskauer's. Unsere 58 Coli-Testobjekte gediehen sämtlich auf diesem Nährboden und manche unter ihnen sogar besser als auf peptonisiertem Wasser. Allein wir besitzen auch einen Typhusstamm No. 3, Zr, der, wenn auch erst spät und langsam, doch auf dieser Nährsubstanz wächst. Ebenso schwach gedeihen auf dieser Nährsubstanz die ersten 5 Mikrobien unserer Epidemie. Nur No. 6, Ap., der aus dem Brunnenwandschmutz gezüchtet wurde, zeigte ein geringes Wachstum, trotzdem aber nicht so üppig wie beim Coli.

Von den zahlreichen farbsubstanzhaltigen Nährmedien, die zur Züchtung des Typhus- und Coli-Bacillus empfohlen wurden, verwendeten wir Agarneutralrot in Schüttelkulturen nach Rothberger[3]) und Plattenagar mit sauerem Fuchsin nach Ramond[4]). Allein unser

---

1) Schottmüller, Weitere Mitteilungen etc. (Zeitschr. f. Hyg. Bd. XXXVI.)
2) Capaldi und Proskauer, l. c.
3) Rothberger, Differentialdiagnostische Untersuchungen etc. (Centralbl. f. Bakt. etc. Abt. I. Bd. XXV.)
4) Ramond, Nouveau milieu etc. (Soc. Biol. 1892. No. 26.)

Tabelle 3.

	1. Serum N. J.				2. Serum A. R.				3. Serum N. R.				4. Serum G. R.				5. Serum V. R.				6. Serum T. R.				7. Immunserum N. J. (1)			
	1:30	1:50	1:80	1:100	1:30	1:50	1:80	1:100	1:30	1:50	1:80	1:100	1:30	1:50	1:80	1:100	1:30	1:50	1:80	1:100	1:30	1:50	1:80	1:100	1:100	1:500	1:1000	1:4000
Typhus-testobjekt	++	+	—	0	++	+	—	0	++	+	—	0	++	+	—	0	++	+	—	0	++	+	—	0	++	+	0	0
Colilab-testobjekt	++	+	—	0	++	+	—	0	++	+	—	0	++	+	—	0	++	+	—	0	++	+	—	0	++	+	—	0
Epidemie-bac. No.1, N. J.	++	+	—	0	++	+	—	0	++	+	—	0	++	+	—	0	++	+	—	0	++	+	—	0	++	++	++	++
Epidemie-bac. No.2, N. J.	++	+	—	0	++	+	—	0	++	+	—	0	++	+	—	0	++	+	—	0	++	+	—	0	++	++	++	++
Epidemie-bac. No.3, N. R.	++	+	—	0	++	+	—	0	++	+	—	0	++	+	—	0	++	+	—	0	++	+	—	0	++	++	++	++
Epidemie-bac. No.4, G. R.	++	+	—	0	++	+	—	0	++	+	—	0	++	+	—	0	++	+	—	0	++	+	—	0	++	++	++	++
Epidemie-bac. No.5, V. R.	++	+	—	0	++	+	—	0	++	+	—	0	++	+	—	0	++	+	—	0	++	+	—	0	++	++	++	++
Epidemie-bac. No.6, Ap.	++	+	—	0	++	+	—	0	++	+	—	0	++	+	-	0	++	+	—	0	++	+	—	0	++	++	++	++

	8. Immunserum N. J. (2)				9. Immunserum N. R.				10. Immunserum G. R.				11. Immunserum V. R.				12. Immunserum Ap.				13. Typhusimmunserum				14. Colilabimmunserum			
	1:100	1:500	1:1000	1:4000	1:100	1:500	1:1000	1:4000	1:100	1:500	1:1000	1:4000	1:100	1:500	1:1000	1:4000	1:100	1:500	1:1000	1:4000	1:100	1:500	1:1000	1:4000	1:100	1:500	1:1000	1:4000
Typhus-testobjekt	++	+	0	0	++	+	0	0	++	+	0	0	++	+	0	0	++	+	0	0	++	++	++	++	+	0	0	0
Colilab-testobjekt	++	+	—	0	++	+	—	0	++	+	—	0	++	+	—	0	++	+	—	0	+	0	0	0	++	++	++	++
Epidemie-bac. No.1, N. J.	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+	0	0	0	++	+	—	0
Epidemie-bac. No.2, N. J.	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+	0	0	0	++	+	—	0
Epidemie-bac. No.3, N. R.	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+	0	0	0	++	+	—	0
Epidemie-bac. No.4, G. R.	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+	0	0	0	++	+	—	0
Epidemie-bac. No.5, V. R.	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+	0	0	0	++	+	—	0
Epidemie-bac. No.6, Ap.	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+	0	0	0	++	+	—	0

Bakterium No. 6, Ap. erzeugte eine vollständige Entfärbung mit äußerst ausgedehnter Fluorescenz des ersten Mediums und auf dem zweiten eine breite, tiefrote Aureole rings um die Kolonieen. Diese Erscheinungen sind bedeutend weniger ausgesprochen bei den übrigen 5 Bakterienstämmen. So erzeugen die Bakterien No. 1, N. J. und No. 2, N. J. keine Fluorescenz in der Nährsubstanz Rothberger's, während die Farbe derselben kaum etwas abgeblaßt ist, auf Ramond'schem Agar erscheinen die Kolonieen von einem schmalen, kaum rosig angehauchten Kreis umgeben. Bei den Bakterien No. 3, N. R., No. 4, G. R. und No. 5, V. R. sind diese Charaktere ausgesprochener als bei den ersten beiden; allein sie erreichen nicht den Intensitätsgrad derjenigen Erscheinungen, die beim Bakterium No. 6, Ap. beobachtet wurden. So wird der Agar Rothberger's gelb und ein wenig ins rötliche spielend, aber nicht rein gelb und fluorescent wie beim letzteren; die Aureole, die die Kolonieen auf dem Ramond'schen Agar umgiebt, ist etwas breiter, deren Farbnuance etwas dunkler als bei No. 1 und No. 2, aber nicht fuchsinrot wie bei No. 6. Ist die Eigenschaft, Neutralrot zu reduzieren und Fuchsin zu regenerieren, ein ausschließliches Zubehör des Coli, der sich hierdurch vom Typhus unterscheidet, so sind wir, auch auf Grund dieser Eigenschaft, berechtigt, anzunehmen, daß unsere Epidemiebakterien viel eher mit dem ersten dieser beiden Mikroorganismen verwandt sind.

Es bleibt uns nur noch übrig, die mittels des Studiums des Agglutinationsphänomens, das wir als diagnostisches Erkennungsmittel unserer Bakterien applizierten, erzielten Resultate zu schildern. Diese Ergebnisse lassen sich in der Tabelle 3 vergleichen. Um den Vergleich leichter zu gestalten, haben wir in diese Tabelle eingereiht: 1) Die Angaben der mit dem Serum unserer Kranken, sowohl mit einem wirklichen Typhus wie auch mit einem typischen, aus den Faeces gezüchteten Coli (nennen wir ihn Colilab) vergleichsweise angestellten Agglutinationsprobe. 2) Das Vermögen der gegenseitigen Agglutination dieser verschiedenen Sera in deren Wirkung auf unsere Epidemiebakterien. 3) Das gegenseitige Vermögen des experimentellen Immunserums, einerseits mittels der 6 Epidemiebakterien und andererseits mit Typhus und Colilab erhalten, diese verschiedenen Bakterien zu agglutinieren. Es ist nicht nötig, die Gründe auseinandersetzen, die uns hierbei geleitet haben; handelte es sich darum, auch auf diese letztere Weise festzustellen, inwieweit unsere Epidemiebakterien, einerseits untereinander und andererseits mit Typhus und einem zum Vergleiche benutzten typischen Coli verwandt sind. In den ersten 6 vertikalen Spalten der Tabelle 3 sind die Grade angegeben, in welchen die 6 Sera der 6 Kranken das an dem linken Ende der betreffenden horizontalen Linie angegebene Bakterium agglutinieren. In den letzten 8 vertikalen Spalten verzeichneten wir die Maße, in welchen die Immunsera der mit den Epidemiebakterien, Typhus und Colilab, vaccinierten Tiere das an demselben Ende der betreffenden horizontalen Linie angegebene Bakterium agglutinieren.

Wir beschränkten uns darauf, in der Tabelle für jedes versuchte Serum 4 Agglutinationsgrade anzugeben, die wir der Kürze halber mittels folgender Zeichen angeben: ++ bedeutet vollständig gleich oder höchstens nach 30 Minuten auftretende Agglutination, + bedeutet vollständige Agglutination, die nach 1 Stunde eintritt; — unvollkommene Agglutination nach 2 Stunden; 0 nicht auftretende Agglutination, selbst

nach Verlauf mehrerer Stunden. Die Maximalgrenze des in der Tabelle angegebenen Agglutinationsvermögens der Sera sämtlicher Kranken ist im Verhältnis von 1 : 100, indem in dieser Diluation keines dieser Sera die versuchten Bakterien zu agglutinieren vermag. Für die Immunsera ist die Maximalgrenze 1 : 4000, da dies die Grenze ist, bis zu welcher wir die agglutinierende Kraft des Serums unserer Tiere auf das gleichnamige Bakterium, mit welchem dieselben vacciniert wurden, zu steigern vermochten. Sobald wir jenseits dieser Grenze vaccinierten, begannen unsere Tiere kachektisch zu werden, und anstatt den Wert ihres Serums zu steigern, wurde derselbe verringert und die Tiere verendeten. Wir verwendeten zur Vaccination Kaninchen, denen subkutan die Kulturen des betreffenden Bacillus einverleibt wurden, die wir dem Agar entnahmen, in physiologischer Kochsalzlösung aufschwemmten und durch Hitze abtöteten. Die Vaccinationsdosen waren 1—3 reich entwickelte Kulturen, die Vaccinationsdauer betrug 6—8 Wochen; die Pause zwischen den Vaccinationen richtete sich nach dem lokalen und dem allgemeinen Zustande der Tiere und betrug 5—9 Tage.

Aus der Tabelle 3 ist ersichtlich, daß die Sera der 6 Kranken den Typhusbacillus genügend agglutinieren, um neben den klinischen Symptomen die Annahme der Typhusdiagnose zu rechtfertigen. Thatsächlich agglutinieren diese sämtlichen Sera den Typhusbacillus im Verhältnis von 1 : 30, und erzielten wir Agglutination selbst noch in Diluation von 1 : 50; diese letztere allerdings erst spät, etwa nach 1 Stunde, aber dann durchaus vollkommen. Jenseits dieser Diluationsgrenze sinkt die agglutinierende Kraft ganz erheblich: 1 : 80 giebt Agglutination, aber noch später, etwa nach Stunden, und ist sie jetzt nicht mehr vollkommen; die Haufen sind klein und finden sich zwischen diesen zahlreiche Individuen mit uneingeschränkter Beweglichkeit. Nur wenn mit einer Verdünnung von 1 : 100 gearbeitet wurde, war Agglutination überhaupt nicht mehr zu erzielen. Sämtliche Sera der 6 Kranken zeigten von diesem Gesichtspunkte aus ein durchaus gleiches Verhalten. Allein sie agglutinierten in demselben Maße den von uns zum Vergleich benutzten Coli lab. Es ist nicht nötig, erst darauf aufmerksam zu machen, daß nicht jeder Coli in diesem Verhältnisse durch diese Sera agglutiniert wird. Von unseren 58 Coli wurden die meisten gar nicht agglutiniert; einige zeigten das Agglutinationsphänomen nur in sehr schwachen Verdünnungen, etwa bei 1 : 10—1 : 15. Colilab ist der einzige typische Coli, Glukose und Laktose in Gärung versetzend, Milch koagulierend, 5 Proz. Säure in der Petruschky'schen Nährsubstanz erregend, Indol bildend u. dergl., der diesen Agglutinationsgrad bietet und den wir nur nach zahlreichen und mühsamen Versuchen finden konnten. Und wie sehr bedurften wir eines derartigen Coli-Exemplars, um die Verwandtschaft unserer Epidemiebakterien mit der Coli-Familie zu erforschen!

Außerdem ist aus der Tabelle 3 ersichtlich, daß, was die Agglutination betrifft, ein gegenseitiges Verhältnis zwischen den Sera dieser 6 Kranken und der Bakterienepidemie vorhanden ist; jedes Bakterium wird durch das Serum eines jeden Kranken agglutiniert. Von diesem Gesichtspunkte aus ist also zwischen diesen Bakterien kein Unterschied vorhanden, ebenso wie sie von demselben Gesichtspunkte aus untereinander sich nicht vom Typhus und Colilab unterscheiden. Bemerkenswert ist noch, daß das Serum irgend eines dieser Kranken das von diesem selbst gewonnene Bakterium nicht stärker agglutiniert als das Bakterium eines anderen Kranken oder jenes, das aus den Brunnen-

wänden gezüchtet wurde. Es wäre hieraus zu folgern, daß dem Blute nicht ein größeres agglutinierendes Vermögen auf einen Mikroorganismus, der ehemals in demselben geweilt hat, innewohnt als auf Individuen derselben Art, die aber anderweitig gewonnen wurden. Wir sind um so mehr berechtigt, dies anzunehmen, als wir Gelegenheit hatten, diese Thatsache zu bestätigen, indem wir das Agglutinationsvermögen des Typhusblutes auf den Typhusbacillus aus dem Laboratorium und auf dem Bacillus, der aus dem Organismus des betreffenden Kranken gezüchtet wurde, prüften.

Diese Ergebnisse, die wegen des Zweifels, in den sie uns betreffend die Bedeutung der Agglutinierung, die wir mit den Sera unserer Kranken erzielten, versetzten, interessant sind, lieferten uns nicht genügende Fingerzeige über den zweiten Punkt, den wir insbesondere im Auge hatten, die Identifizierung der Epidemiebakterien und deren spezifischen Zusammenhang mit Typhus oder Coli. Aus diesem Grunde nahmen wir unsere Zuflucht zur Feststellung des Agglutinationswertes des Serums der immunisierten Tiere, wie dies aus den letzten 8 Spalten der Tabelle 3 ersichtlich ist. Die 7. und 8. Spalte dieser Tabelle schildert die Wirkung des Immunserums entsprechend den intra vitam und post mortem von N. J. gezüchteten Bakterien. Die 9., 10. und 11. Spalte giebt die Resultate wieder, die wir mit dem Immunserum entsprechend den aus den 3 in ihrer Häuslichkeit beobachteten Patienten gezüchteten Bakterien erzielt haben. Die 12. Spalte schildert die Wirkung des Immunserums entsprechend dem aus der Brunnenwand gezüchteten Bakterium und die 13. und 14. Spalte die Wirkung des Immunserums, das mit dem Typhus und Coli dargestellt wurde. In dieser Untersuchungsreihe fehlen 2 unserer Kranken, die im Krankenhause behandelte Schwangere und das ältere der in in ihrer Häuslichkeit besuchten 3 Kinder. Es soll hier wiederholt werden, daß bei der ersteren die besonderen Umstände, in denen sich dieselbe befand, es nicht gestatteten, daß das Blut bakteriologisch untersucht wurde, während bei dem zweiten Patienten, der sich bereits in der Rekonvalescenz befand, die Kulturen steril blieben.

Durchblickt man diese 8 Spalten, so ergiebt sich ein hochwichtiges Faktum: Die absolute Gegenseitigkeit, die zwischen unseren 6 Epidemiebakterien vorhanden ist, insofern es sich um die agglutinierende Wirkung der betreffenden Immunsera handelt. Jedes der 6 Immunsera agglutiniert in vollständiger Weise im Verhältnis von 1 : 4000 und höchstens nach 30 Minuten jedes der 6 Bakterien. Gleichzeitig bemerkt man die Unterschiede zwischen den Epidemiebakterien einerseits und Typhus und Colilab andererseits. So hat unser Typhusimmunserum, das den entsprechenden Typhusbacillus vollständig und rasch bis zum Verhältnis 1 : 4000 agglutiniert, eine bedeutend schwächere Agglutinationskraft auf die Epidemiebakterien und den Colilab. Für diese letzteren wird die Agglutinierung mittels Typhusimmunserum, die im Verhältniss von 1 : 100 noch vollständig, aber erst spät eintritt, bei der Verdünnung von 1 : 500 gänzlich aufgehoben. Ebenso ist das Colilabimmunserum, das den Colilab bis zum Verhältnis von 1 : 4000 agglutiniert, wesentlich geringer wirkend auf die Epidemiebakterien und noch schwächer dem Typhus gegenüber. Während also die Agglutinierung des Typhusbacillus mittels Colilabimmunserum vollständig, wenn auch spät, eintritt, nur im Verhältnis von 1 : 100, und überhaupt bei 1 : 500 fehlt, ist die der Epidemiebakterien rasch und vollkommen bei 1 : 100, vollständig aber

tardiv bei 1:500, unvollständig selbst bei 1:1000 und fehlt nur dann, wenn die Verdünnung noch größer ist.

Indem wir nun an das Ende unserer Schilderung gelangt sind, sei es uns gestattet, in wenigen Worten die sich ergebenden Schlußfolgerungen zu besprechen. Die erste dieser Schlußfolgerungen scheint diejenige zu sein, die sich auf die Natur unserer Epidemiebakterien bezieht. Hierzu werden auch jene Feststellungen behilflich sein, die vor uns schon von anderen Verfassern gemacht worden sind. Außer den Veröffentlichungen Schottmüller's[1]) fanden wir in der Litteratur nichts, das unsere Aufmerksamkeit gefesselt hätte. Thatsächlich ist dies der einzige Autor, dessen bakteriologische Untersuchungen — die vom Standpunkte der exakten Technik und dem Werte der benutzten Methoden aus durchaus vorwurfsfrei sind — den Beweis erbracht haben, daß im Blute von 6 von ihm beobachteten — klinisch entschieden als Typhus charakterisierten — Krankheitsfällen ausschließlich Bakterien vorhanden waren, die von den Eberth'schen durchaus verschieden gewesen sind. Der Autor ist geneigt, für diese Mikroorganismen eine besondere Klasse zu schaffen, indem er dieselben „typhusähnliche“ oder „paratyphische Bacillen“ und die von ihnen veranlaßte Krankheit „Paratyphus“ nennt. Es ist dies der einzige Punkt, worin wir mit Schottmüller nicht übereinstimmen. Welche Verwandtschaft ist denn eigentlich zwischen den vom Autor erforschten Bakterien und dem Eberthschen Bacillus vorhanden? Wir wollen es versuchen, diese angebliche Verwandtschaft zu prüfen, und zwar gestützt auf die vom Autor selbst gegebenen Charakteristiken, und beginnen mit jenem Kriterium, das nach den neuesten Angaben der Bakteriologie den größten Wert beansprucht, der Serumprobe. 5 der Bakterien Schottmüller's, und zwar die Bakterien Barg, Müller, Köcher, Thot und Seemann, werden im Typhusserum nicht einmal in einer schwachen Verdünnung von 1:33 agglutiniert. Nur das 6. Bakterium Krenzin wird in dieser Diluation agglutiniert. Allein die im Beginn dieser Abhandlung citierten Arbeiten belehrten uns zur Genüge, welcher Wert derartigen schwachen Agglutinierungen zuerkannt werden kann, wenn es sich darum handelt, uns über die Diagnose eines verdächtigen Bakteriums auszusprechen. Uebrigens ist selbst aus der Tabelle des Autors ersichtlich, daß zwischen Bacterium Krenzin und Typhus nicht eine größere Verwandtschaft vorhanden ist als zwischen Typhus und typischem Coli. Im Gegenteil, viel eher ergäbe sich eine solche zwischen Coli von den beiden Coli-Testobjekten des Verf.'s das eine genau wie und Typhus als zwischen diesem letzteren und Bact. Krenzin, indem Bact. Krenzin mittels Typhusserums im Verhältnis von 1:33, das andere bis zu 1:50 agglutiniert wird. Ebensowenig spricht für eine Verwandtschaft der Schottmüller'schen Bakterien mit Typhus die Gegenprobe, nämlich die Agglutinierung des Typhusbacillus mittels der Sera dieser Kranken. Keines dieser Sera ergab eine noch so schwache Agglutination der Schottmüller'schen Bakterien.

Die Verwandtschaft mit Typhus könnte viel eher für unsere Epidemiebakterien zugelassen werden, indem das Serum unserer Kranken den Typhusbacillus in bedeutenderem Maße agglutiniert, wie dies aus Tabelle 3 ersichtlich ist. Allein die Hypothese dieser Verwandtschaft schwindet, wenn wir uns dessen erinnern, daß unser Colilab in dem-

1) Schottmüller, l. c. in Zeitschr. f. Hyg.

selben Maße von den Sera unserer Kranken agglutiniert wird. Bestimmend sind nur die mit unseren Immunsera erzielten Resultate, denn während wir nach den mit den Sera der Kranken erzielten Ergebnissen urteilend annehmen müßten, daß unsere Epidemiebakterien mit Typhus und Colilab identisch sind, zeigten uns die Immunsera das Gegenteil: Sie bewiesen die Verwandtschaft mit Colilab und die Verschiedenheit vom Typhus. Es ist sehr wahrscheinlich, daß, wenn auch Schottmüller mit Immunseren gearbeitet hätte, auch für seine Bakterien ein größerer Verwandtschaftsgrad mit Coli sich ergeben hätte als derjenige, der allein mittels des Serums der Kranken sichtbar gemacht werden konnte.

Die Verwandtschaft der Schottmüller'schen Bakterien mit Coli erhellt aber auch aus deren kulturellen Charakteren. Selbstverständlich sind viele ihrer Eigenschaften abweichend von jenen des Coli, allein es bleiben noch andere fundamentale, die es nicht gestatten, daß sie aus dieser Gruppe abgesondert werden. So ist kein Zweifel zulässig über die Klassifikation eines Bacillus der Familie Coli—Typhus, insofern derselbe Glukose in Gärung überführt. Da aber sämtliche Schottmüller'schen Bakterien Glukose stark in Gärung versetzen und außerdem auch Laktose energisch angreifen, da sie, außer Barg und Müller, sämtlich auf Kartoffel typisch wachsen, Neutralrot entfärben etc., so können sie eben nur als Coli angesehen werden. Von den atypischen Charakteren der Schottmüller'schen Bakterien würde allein das Fehlen der Indolbildung in die Wagschale fallen. Allein mag diese Eigenschaft beim Coli noch so oft vorkommen, so kann sie doch heute nicht als absolut gelten. Wir haben dafür Beispiele angeführt, und ohnedies sind seit der Lembke'schen[1]) Mitteilung noch andere Beobachtungen über „Coli anindolicum" veröffentlicht worden.

Was nun die von unserer Epidemie isolierten Bakterien anbetrifft, die durch ihr geringes Angreifen der Glukose und deren Indifferenz der Laktose gegenüber sich vom typischen Coli noch mehr als Schottmüller's Bakterien unterscheiden, so können dieselben nur als Vertreter eines und desselben anormalen Bakteriums aus der Coli-Gruppe angesehen werden, wenn wir ihre noch so geringe gaserzeugende Wirkung und überhaupt die Resultate der Serumagglutination im Auge behalten. Denn thatsächlich beweist nicht das Agglutinationsphänomen für sich, sondern auch dessen Stärke den Verwandtschaftsgrad zwischen dem agglutinierten Mikrobion und demjenigen, unter dessen Einfluß das Blut diese Eigenschaft erlangt hat. Wir glauben uns berechtigt, aus dem Geschilderten zu schließen, daß die Epidemiebakterien identisch und mit Coli viel eher verwandt sind als mit Typhus.

Sind die Schlußfolgerungen der von uns beobachteten Thatsachen wahr, so sind es zwei Punkte, die keinem entgehen werden:

a) Die eventuelle Pathogenität des Coli und die Bedeutung, die ihm zukommt, wenn er im Trinkwasser vorhanden ist.

b) Die Fehler, die unterlaufen können, wenn es sich um die Diagnose des Typhus handelt.

Ad a. Hier wollen wir nicht die Umwandlungen der Ansichten der Bakteriologen über die Infektiosität des Trinkwassers schildern. Wenn wir uns nur auf das Coli beschränken, so erwähnen wir, daß

1) Lembke, Bacterium coli anindolicum etc. (Arch. f. Hyg. Bd. XXVII.)

sein Vorhandensein im Trinkwasser, das ursprünglich als schwerwiegender Beweis einer Infektion gegolten hat, später aber als unschädlich aufgefaßt wurde, so daß dann nur jene Coli als gefahrbringend angesehen werden, die Tieren gegenüber pathogen sind, während in neuerer Zeit selbst dieser Pathogenität keine Bedeutung zuerkannt wird[1]). Absolut berechtigt ist keine dieser Annahmen. Die Wahrheit ist unserer Ansicht nach folgende: Im Trinkwasser kann, vom hygienischen Standpunkte aus, der Coli ganz bedeutungslos sein; allein er kann auch sehr gefährlich werden. Daß er unschädlich sein kann, lehrt die tägliche Beobachtung, daß große Menschenanhäufungen Coli-haltiges Wasser ohne irgendwelche Schädigung genießen. Daß aber solches Wasser manchmal schwere Allgemeininfektionen veranlassen kann, beweist die Beobachtung Schottmüller's, der mit großer Wahrscheinlichkeit annimmt, daß in seinen Fällen das Wasser als Infektionsquelle gedient hat; ebenso wie es die Beobachtung Sternberg's, der aus typhusverdächtigen Wässern Bakterien züchtete, die den Schottmüller'schen und den unseren analog waren, beweist; außerdem wird dies überhaupt bestätigt durch unsere Hausepidemie, die keinen Zweifel zuläßt, daß die Infektion auf das Wasser zurückzuführen ist.

Interessant wäre es, die einzige Frage zu lösen: Ist jeder Coli gegebenen Falles imstande, unter besonderen Umständen, von dem Organismus, in den er einwandert, abhängend, infektiös zu werden oder aber kommt diese Eigenschaft nur jenen atypischen Formen zu, die Schottmüller und wir zu beobachten Gelegenheit hatten? Trifft diese letztere Ansicht zu, so wären wir gezwungen, eine besondere Gruppe zu schaffen, die jene atypischen Coli enthält, die fähig sind, beim Menschen pseudotyphische Infektionen zu veranlassen. Allein wir sind weit davon entfernt, auf diese Frage antworten zu können. Werden spätere Untersuchungen dieses Dunkel aufhellen, dann werden wir befriedigt sein, zusammen mit Schottmüller auf dieses Vorkommen aufmerksam gemacht zu haben.

Ad b. In unseren Fällen hat uns selbst die Serumprobe getäuscht. Vielleicht würde es gelingen, für die Zukunft derartige Irrtümer zu beseitigen, wenn anstatt 1 : 50 oder noch weniger, wie es heute giltig ist, eine Verdünnung von 1 : 100 oder mehr als minimale Grenze der sicheren Typhusprobe sanktioniert würde. Nur würden dann, glauben wir, ganz entgegengesetzte Fehlgriffe entstehen, und zwar würden dann viele Typhusfälle gar nicht durch die Serumprobe diagnostiziert, indem es uns ja bekannt ist, daß gar nicht selten beim Typhus das Agglutinationsvermögen erst spät energischer wird, so daß die Serumprobe nur in der letzten Krankheitswoche oder gar in der Rekonvalescenz positiv ausfällt.

Weit entfernt davon, die prinzipielle Bedeutung der Gruber'schen Entdeckung zu verkennen und ohne das Widal'sche Verfahren als ein in der Erkennung der meisten Typhusfälle wertvolles Hilfsmittel bestreiten zu wollen, dürfen wir doch nicht außer Acht lassen, daß in bestimmten Fällen die Serumreaktion selbst uns im Stiche läßt. Aus diesem Grunde glauben wir, daß das einzige, jedweden Irrtum ausschließende Mittel nur die direkte Bestimmung des Bakteriums in den Medien des Organismus sei. Es ist aber bekannt, wie schwierig es ist,

---

1) Weisenfeld, Der Befund des Bacterium coli im Wasser und das Tierexperiment etc. (Zeitschr. f. Hyg. Bd. XXXV.)

den Typhusbacillus in den Stuhlentleerungen aufzufinden; andererseits hat man von verschiedenen Seiten auf die Gefahren der Milzpunktion aufmerksam gemacht. Es erübrigt nur noch die Darstellung des Mikroorganismus im Blute.

Hierüber sind die Mitteilungen Schottmüller's[1]), Auerbach und Unger's[2]), Castelani's[3]), Courmont's[4]), daß der Typhusbacillus ständig und frühzeitig im Blute erscheint, begründet; sind Schottmüller's und unsere Beobachtungen, die dasselbe für die von einigen Coli-Typen veranlaßten Infektionen behaupten, richtig, werden diese Resultate auch von anderen Verff.'n bestätigt — dann ist es über allen Zweifel erhaben, daß der letzte Stein zum Baue des Gebäudes der Diagnostik des Typhus herbeigeschafft worden ist. Gleichzeitig würden diese Untersuchungen die Aufmerksamkeit darauf lenken, daß es Infektionen giebt, die ganz und gar wie Typhus erscheinen und wie Typhus epidemisch auftreten können, die aber bakteriologisch vom Coli veranlaßt sind.

Was uns betrifft, so ist unsere Erfahrung zu gering, um behaupten zu können, daß der Typhusbacillus stets im Blute auftritt. Jedoch sind die Fälle der genannten Autoren zahlreich genug und über allen Zweifel erhaben. Wir können nur versichern, daß die Entnahme von 10, 15, ja sogar von 20 ccm Blut aus einer Arm- oder Ellenbogenvene einen möglichst einfachen Eingriff darstellt. Der Operateur bedarf keiner besonderen Geschicklichkeit, und dem Kranken droht, bei aseptischem Vorgehen, nicht die geringste Gefahr. Der Eingriff ist ebensowenig schmerzhaft wie der Stich in die Fingerkuppe, den wir zum Zwecke der Blutuntersuchung alltäglich vornehmen.

Zur Biologie der Influenzabacillen.

Erwiderung auf die Arbeit über dasselbe Thema von Ghon und v. Preyss.

[Aus dem Laboratorium der II. med. Klinik zu Neapel. Direktor: A. Cardarelli.]

Von Dr. **Arnold Cantani jun.,**
Privatdocent und Präparator in der Klinik.

In einer Arbeit, die unter diesem Titel in jüngster Zeit in diesem Blatte (Bd. XXXII. No. 2) erschienen ist, wurden von den Autoren die von mir in einer früheren Arbeit (Zeitschr. f. Hygiene und Infektionskrankheiten. Bd. XXXVI. 1901) veröffentlichten Resultate über die Züchtung der Influenzabacillen auf hämoglobinfreien Nährböden teilweise nachgeprüft.

Während aber die Herren Ghon und v. Preyss meinen Schlußfolgerungen größtenteils widersprechen, berichten sie im Laufe ihrer

1) Schottmüller, l. c. in Zeitschr. f. Hyg.
2) Auerbach und Unger, Deutsche med. Wochenschr. 1900. No. 49.
3) Castelani, Ref. in Presse méd. 1900. Juin.
4) Courmont, Sur la présence du bacille d'Eberth dans le sang etc. (Journal de physiol. et de pathol. génér. 1901. Janvier.)

Arbeit über eigene Versuche, die als eine Bestätigung meiner Experimente zu betrachten sind.

Um nun den scheinbaren Widerspruch, welcher von den erstgenannten Autoren bei der unklaren Darstellung meiner Versuche verursacht wird, zu widerlegen, erlaube ich mir im Folgenden die Sachen ganz kurz auseinanderzusetzen:

Daß die Influenzabacillen für ihr künstliches Wachstum die Gegenwart von Hämoglobin nicht unbedingt gebrauchen, wurde von mir schon vor einigen Jahren bei Gelegenheit der Anwendung von Stiersperma als Nährbodenzusatz erörtert (Centralbl. f. Bakt. etc. Bd. XXII. p. 601).

Ich prüfte nachher in einer weiteren Versuchsreihe auch andere tierische Flüssigkeiten und die einzelnen Bestandteile derselben und des Blutes selbst auf ihre wachstumsfördernden Eigenschaften gegenüber den Influenzabacillen. Bei diesen Untersuchungen erzielte ich mit Globulin und auch mit Serumalbumin die besten Resultate; das Hämatin Nencki sowie verschiedene andere Substanzen (Lecithin, Nukleïn etc.), die ich mit ins Experiment einbezog, gaben mir negative Resultate. Ich konnte ferner auch mit Mucin aus Galle, Cholestearin, Eidotter, Eieralbumin positive Resultate erhalten, die aber von denjenigen, die ich mit Globulin und Serumalbumin angestellt hatte, weit übertroffen wurden.

Freilich kann man bei einigen der oben erwähnten Substanzen den Einwand nicht ausschließen, daß ganz minimale chemisch sowie spektroskopisch nicht entdeckbare Spuren von Hämoglobin den von mir gebrauchten Substanzen anhaften können; wenn man aber bedenkt, daß ich schon mit Eieralbumin und andere Autoren auch mit Eidotter (Capaldi, Nasstiykoff) positive Resultate erzielten, so ist dieser Einwand schon hinfällig, da man bei den letzten Substanzen die Gegenwart von Blut sicher ausschließen kann.

Bei weiteren Versuchen konnte ich aber noch beweiskräftigendere Schlüsse für meine Annahme ziehen. Ich hatte nämlich Gelegenheit, durch Zusatz von verschiedenen lebendigen oder sterilisierten Bakterienarten zu dem normalen Agar einen Nährboden zu bereiten, auf welchem die Influenzabacillen sich deutlicher entwickelten [1]). Das Wachstum der Influenzastäbchen war noch günstiger, wenn ich dem normalen Agar eine organische Flüssigkeit (Ascitesserum) oder dem gewöhnlichen Blutagar einen die Entwickelung der Influenzabacillen hemmenden Körper (Glycerin) zusetzte. Diese beiden Nährböden, die für die Influenzabacillen als unpassend zu bezeichnen sind, ließen ein sehr üppiges Wachstum derselben wahrnehmen, wenn man ihnen etwas Bakterienmaterial in sterilisiertem oder unsterilisiertem Zustande beimengte.

Daß es nun den Herren Ghon und v. Preyss bei der Wiederholung vieler von den oben citierten Experimenten **nicht einmal** gelungen ist, positive Resultate zu erreichen, bedauere ich sehr; ich kann aber nicht unterlassen, alle meine Schlußfolgerungen aufrecht zu halten. Um indessen eine wörtliche Polemik zu vermeiden, die für beide Teile von keinem Nutzen sein würde, habe ich mir erlaubt, den Herren Kollegen einige Exemplare von meinem Materiale direkt zu schicken, in der Hoffnung, daß die beiden Herren Kollegen

1) Ueber die Verwertung von Bakterien als Nährbodenzusatz. (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Bd. XXVIII. No. 21.)

nach einer direkten Prüfung meiner Resultate sich von der Richtigkeit meiner Behauptungen überzeugen würden.

Den von den Herren Ghon und v. Preyss angestellten Experimenten muß ich aber noch einige Worte widmen, um einige Thatsachen daraus zu beleuchten. Die allerdings sehr unwahrscheinliche Annahme von Ghon und v. Preyss, daß auf den von mir mit Gonokokkenmateriale vermischten Agar auch Blutspuren, aus dem ursprünglichen Gonokokkennährboden stammend (Ascitesagar), mit übertragen werden können, fällt ganz weg, wenn man daran denkt, daß die Influenzabacillen auf demselben für die Gonokokken angewandten Ascitesagar, aber ohne Gonokokkenzusatz, nicht fortkommen. Ich habe übrigens bei diesen Experimenten nicht ausschließlich Gonokokken gebraucht; die Resultate waren auch positiv, wenn ich andere Bakterien anwendete, die keines Ascites- oder Blutnährbodens für ihr Wachstum bedürfen, nämlich Diphtherie, Staphylokokken, gelbe Sarcine, Typhus, Hefen etc.

Daß die für Influenza unpassenden Hämatinnährböden sich als wachstumsfördernd erweisen können, wenn man ihnen andere Bakterien zusetzt, war auch zu erwarten, wenn man die von mir mit Ascites- oder Blutglycerinagar angestellten Experimente betrachtet. Auch diese beiden Nährböden, die für die Kultivierung von Influenza als ganz unpassend zu betrachten sind, geben sehr üppige Influenzakulturen, wenn man darauf neben den Influenzabacillen andere Bakterienarten in lebendigem oder sterilisiertem Zustande mitimpft. Wie es selbstverständlich ist, geben die mit diesen letzteren stark albuminhaltigen Nährböden angestellten Experimente viel brillantere Resultate als diejenigen, die man mit einfachem Agar ausführt, die mit größeren Schwierigkeiten verknüpft sind.

Die von Ghon und v. Preyss mit Hämatinzusatz angestellten Experimente sind daher als eine Bestätigung meiner Versuche aufzufassen.

Ich will auf die Arbeit von Ghon und v. Preyss nicht näher eingehen, um nicht gezwungen zu sein, mich noch öfters zu wiederholen. Wie aus dem eben Gesagten erhellt, sollen die von mir gezogenen Schlußfolgerungen aufrecht erhalten bleiben; es wird vielleicht dem Leser nicht zu viel sein, wenn ich sie in den folgenden Sätzen kurz zusammenfasse:

1) Die Möglichkeit, die Influenzabacillen auf hämoglobinfreien Nährböden züchten zu können, soll man als eine sicher bewiesene Thatsache anerkennen.

2) Daß man mit ausschließlichem Bakterienzusatz das Wachstum eines anderen Bakteriums auf dem sonst unpassenden Nährboden bewerkstelligen kann, wird bei den Influenzabacillen in deutlicher Weise nachgewiesen.

Und gerade auf diese letztere Schlußfolgerung soll die Aufmerksamkeit gelenkt werden, denn die Züchtung von unbekannten oder noch jetzt unzüchtbaren Mikroorganismen wird vielleicht in der Zukunft unter Berücksichtigung dieser neuen Bakteriennährböden erleichtert werden.

Neapel, 20. August 1902.

Die Malaria perniciosa.

Beitrag zur Biologie und Morphologie ihres Erregers.

Von Dr. **G. Maurer**, Arzt am Hospital der Deli-My. Medan-Deli, Sumatra.

Mit 3 Tafeln.

Die *Laverania malariae* (Grassi), der Erreger der Malaria perniciosa, ist schon lange als selbständige Parasitenart anerkannt und von den Erregern der Malaria tertiana und quartana abgegrenzt worden; die Hauptveranlassung dazu ist zu suchen in der auffallenden Gestalt ihrer Gameten, deren Halbmondform so erheblich abweicht von den entsprechenden Gebilden der Tertiana und Quartana. An ihren schizogonetischen Formen wurden weniger charakteristische Unterscheidungsmerkmale gefunden, und auch heute noch hält man eine Differentialdiagnose unter den kleinen Ringformen der drei Malariaarten nur soweit für möglich, als wir imstande sind, die Tertianajugendringe von denen der Perniciosa und Quartana zu trennen.

Meine mehrere Jahre zurückreichenden Untersuchungen, deren Resultate ich im Folgenden mitteilen will, haben mich aber nicht nur gelehrt, die größeren Perniciosaringe mit aller Sicherheit von ihren Verwandten abzuscheiden, sondern auch Merkmale finden lassen, die uns erlauben, die schizogonetischen und sporogonetischen Formen der *Laverania* schon in ihren jüngsten Entwickelungsstadien auseinanderzuhalten. Dem Auffinden dieser morphologischen Eigenarten, welche uns die Sonderstellung der *Laverania* als eigene Species noch weiter begründen hilft, folgte das Erkennen eigenartiger Lebensäußerungen dieses Parasiten und damit die zwanglose Erklärung von klinischen Erscheinungen der Malaria perniciosa, die eine befriedigende Analyse bis dahin noch nicht gefunden hatten.

Alle Angaben und Beschreibungen dieser Arbeit beziehen sich auf Befunde in Trockenpräparaten, welche nach der Romanowsky'schen Methode auf besondere Weise gefärbt wurden; die Sphären und Geißelkörper werden daher nicht besprochen.

Der Perniciosaparasit macht in der Regel nur einen Teil seiner Entwickelung im peripheren Blute durch, so daß wir ihn hier fast ausschließlich in der Ringform sehen; diese Ringe, anfangs winzig klein, 1—2 μ im Durchmesser, wachsen im Verlaufe von ungefähr einem Tage bis zu Scheiben von $^1/_3$—$^1/_2$ Diameter eines roten Blutkörperchens heran, worauf sie aus dem peripheren Kreislaufe verschwinden, um ihre weitere Entwickelung in den Centralorganen fortzusetzen und zu vollenden. Es ist praktisch, das Ringstadium des Parasiten in 2 Perioden zu teilen, wie es R. Koch gethan hat, und von kleinen und großen Ringen zu sprechen; wie später gezeigt werden wird, ist diese Einteilung keineswegs willkürlich, sondern durch morphologische Eigentümlichkeiten des Parasiten vollkommen berechtigt.

Die kleinen Ringe (Taf. I, Fig. 1—6). Die jungen, eben aus der Teilungsform frei gewordenen Parasiten werden nur selten frei im Blute schwimmend gefunden; in der Regel sind sie an ein rotes Blutkörperchen angeheftet und zwar mit Vorliebe an dessen Rande; sie sind

sehr klein, ihren Wirten platt angeschmiegt und können nur in gut gefärbten Präparaten deutlich erkannt werden. Ganz ausnahmsweise hat der eine oder andere kleine Ring das Aussehen, wie er es als Merozoit in der Teilungsform bietet, beibehalten (Taf. I, Fig. 1 und 2), d. h. er besteht nur aus 2 Teilen: einem roten Chromatinkorn und einem blauen Protoplasmaleib. In den meisten Parasiten ist schon in diesem frühesten Jugendzustande ein neuer Bestandteil ihres Leibes aufgetreten: eine nicht färbbare Masse, die sich zwischen das rote Chromatinkorn und die blaue Hülle gleichsam eingeschoben hat, und die wir vorläufig den ungefärbten Teil des Parasiten nennen wollen (Taf. I, Fig. 3—6). Liegt ein solcher Schizont, bei dem alle 3 Bestandteile vorhanden sind, auf der breiten Fläche eines Blutkörperchens auf, so präsentiert er sich gewöhnlich in der Ringform, nach welcher er in dieser Entwickelungsperiode auch benannt wird: der blaue Teil, das Protoplasma, bildet den zierlichen, meist mit einer kleinen Anschwellung versehenen Ring, in dessen dünnstem Teile das intensiv rote, punktförmige Korn eingelassen ist, während das Innere des Ringes eingenommen wird von dem ungefärbten Teile.

Die Frage, welcher Bestandteil des Parasiten als Kern aufzufassen sei, ist vielfach behandelt worden, aber — soviel mir bekannt — noch nicht endgiltig gelöst, und ich will ganz kurz die Ansichten einiger Autoren über diesen Punkt hier anführen. Mannaberg betrachtet in seiner Monographie der Malariaparasiten[1]) (p. 29) den ungefärbten Teil als Kern, den rotgefärbten als Kernkörperchen; seiner Auffassung habe ich mich früher angeschlossen. G. Bastianelli und A. Bignami[2]) sprechen das Chromatinkörperchen als Kern an und lassen diesen umgeben sein von einem schmalen, hellen Hofe, während der ungefärbte Teil für sie ein leerer Raum, eine Vakuole ist; sie stellen sich damit auf den Standpunkt Kruse's[3]), der den jungen Parasiten auch als Ring ansieht. Um dieser Streitfrage kritisch nähertreten zu können, ist es nötig, die in Betracht kommenden Elemente einer genaueren Prüfung zu unterziehen.

Der rotgefärbte Teil — ich bezeichne ihn jetzt als Kern — ist in den jüngsten Parasiten eine punktförmige, kompakte Masse von dunkelkarminroter Farbe; er ist entweder in den Protoplasmareif selbst eingelassen oder liegt im Centrum des Ringes und erscheint allseitig umgeben vom ungefärbten Teile. Sehr oft sind statt eines Kernes deren 2 oder selbst 3 vorhanden, welche ähnlich gelagert sind, entweder einander gegenüber im Protoplasmaringe selbst oder inmitten des centralen ungefärbten Teiles. Mit dem Wachstume des Parasiten nimmt auch der Kern an Volumen zu, und Hand in Hand damit geht eine oft sehr deutlich ausgesprochene Differenzierung einher, so daß wir dann im Inneren des Kernes einen oder mehrere intensiv dunkelrote Körner unterscheiden können von einem sie umgebenden lichten Hofe: nämlich die von Kernsaft umschlossenen Kernkörperchen.

Der ungefärbte Teil ist bei den Merozoiten in der Teilungsfigur noch nicht vorhanden; er fehlt jedoch nur ausnahmsweise, wenn

1) Mannaberg, J., Die Malariaparasiten. Wien 1893.

2) Bastianelli, G. und Bignami, A., Ueber die Struktur der Malariaparasiten, insbesondere der Gameten der Parasiten des Aestivoautumnalfiebers. (Unters. z. Naturlehre des Menschen u. der Tiere von J. Moleschott. Bd. XVIII. Gießen 1900.)

3) Cit. nach Schüffner, Beitrag zur Kenntnis der Malaria. (Dtsch. Arch. f. klin. Med. Bd. LXIV.)

uns der Parasit frei im Plasma oder auf einem Blutkörperchen begegnet, und wir erhalten den Eindruck, als ob der junge Parasit ausschließlich dem Auftreten des farblosen Teiles seine Volumszunahme zu verdanken habe. Es ist nun auffallend, daß die Grenze zwischen Protoplasma und ungefärbtem Teile stets eine mathematisch scharfe Linie ist, meist kreisförmig, hier und da oval, wie das am klarsten zu sehen ist an den, freilich sehr seltenen, frei im Blutplasma liegenden Parasiten (Taf. I, Fig. 4). Sehr deutlich tritt diese Erscheinung aber auch zu Tage an Parasiten, welche sich dem Rande des Blutkörperchens eben angelagert oder in dessen Substanz eingedrückt haben (Taf. I, Fig. 6); im ersten Falle liegt das Protoplasma wie ein Polster am Blutkörperchen, auf ihm ruht als zierlicher, farbloser Kreis, in das Plasma ragend, die ungefärbte Substanz mit dem rotgefärbten Kerne, der meist auf dem distalsten Punkte der Kreislinie seinen Platz hat; im zweiten Falle bildet der ungefärbte Teil wieder eine genau kreisrunde Scheibe, deren eine Hälfte in das Blutkörperchen einschneidet, während die andere sich in das Blutplasma vorwölbt. Aus diesen Thatsachen:

1) daß der Kern in unseren mikroskopischen Bildern auch innerhalb des centralen, farblosen Teiles des Parasitenkörpers liegen kann resp. auf diesem;
2) daß sich das Protoplasma stets in scharfer Kreislinie gegen den ungefärbten Teil abgrenzt, während seine äußeren Konturen oft sehr unregelmäßig sind;
3) daß der ungefärbte Teil auf ein rotes Blutkörperchen einen kreisrunden Eindruck hervorbringen oder selbständig als Kreis in das Blutplasma ragen und den Kern tragen kann

geht nicht allein hervor, daß der ungefärbte Teil materiell vorhanden sein, sondern auch, daß er — wegen seines Verhaltens gegen das ihn umschließende Protoplasma — aus einer flüssigen Masse bestehen muß. Diese Flüssigkeit ist in der Teilungsform noch nicht anwesend, sie wird erst nachträglich in den Parasitenleib aufgenommen. Der ungefärbte Teil kann daher niemals ein leerer Raum sein, wie das bei einem Ringe der Fall ist; er ist auch kein Teil des Kernes, da sich nicht das geringste Zeichen für eine Zusammengehörigkeit dieser beiden Elemente finden läßt, sondern er ist aus dem Blute aufgenommene Nahrung, Plasma, und ich nenne ihn in Analogie zu dergleichen bekannten Bildungen unter den Protozoen die Nährvakuole. Die Erkenntnis dieser Thatsache erklärt uns auch die bisher so rätselhafte, schlechte Färbbarkeit dieses Bestandteiles.

Der rotgefärbte Teil, das Chromatinkorn, stellt den Kern vor; er enthält sehr oft ein oder mehrere Kernkörperchen. Der schmale, helle Hof, welchen Bastianelli und Bignami als essentiellen Kernbestandteil anzusehen scheinen, ist nicht regelmäßig vorhanden, und ist dieselbe Erscheinung wie jener helle Hof, der uns in den nach Romanowsky gefärbten Präparaten so oft den Kern der kleinen Lymphocyten zu umschließen scheint; er entsteht höchst wahrscheinlich infolge der Präparation durch Schrumpfung und Retraktion des Kernes.

Wir müssen uns nach diesen Ausführungen den jungen Perniciosaparasiten vorstellen als Protoplasmakügelchen resp. -scheibchen, in welchem als integrierender Bestandteil ein Kern und neben diesem, als Element von untergeordneter Bedeutung, eine Nährvakuole eingeschlossen sind.

Das Protoplasma hat in unseren Trockenpräparaten meist die

Ruheform angenommen und erscheint als Ring. Nur in wenigen Exemplaren der gefärbten Parasiten ist es in seiner Gesamtheit oder an seiner Peripherie reichlich verzweigt, weist bizarre Bildungen auf oder erstreckt sich fingerartig über das Blutkörperchen und zeigt uns dadurch, in welch lebhafter Bewegung es im Leben begriffen war. Die randständigen Parasiten tragen den Kern meist auf der dem Blutkörperchen abgewandten Seite, während ihr Protoplasma mit seiner Hauptmasse dem Blutkörperchen innig anliegt, ja sehr oft den Blutkörperchenrand von beiden Seiten wie eine Klammer umgreift. Aus solchen Bildern erkennen wir, daß das Protoplasma eine ganz bedeutende Rolle als Haftorgan spielt, und es wird uns klar, warum der Parasit eine so ausgesprochene Vorliebe für den Rand der Blutscheibe hat: der Perniciosaschizont lebt ja, wie schon lange bekannt ist und wie unsere Untersuchungen noch bestätigen werden, eine ziemlich lange Zeit — während des ganzen Ringstadiums — auf dem Erythrocyten und findet die beste Gelegenheit, sich festzusetzen an dem schmalen Rande, den er von beiden Seiten umfassen kann.

Als bedeutendere, für uns wahrnehmbare Lebensäußerungen des jungen Perniciosaparasiten beobachten wir also während des Stadiums der kleinen Ringe nur das Festsetzen des Schizonten auf dem Blutkörperchen und die Aufnahme von Nahrung in Gestalt einer Nährvakuole. Eine Einwirkung auf die Wirtszelle ist noch nicht wahrzunehmen; diese beginnt erst, wenn der Parasit etwas älter geworden ist und charakterisiert das Stadium der großen Ringe.

Färberische Unterscheidungsmerkmale zwischen den kleinen Perniciosaringen und den jüngsten Formen der Tertiana und Quartana bestehen nicht; der geübte Untersucher wird jedoch mit Hilfe verschiedener Umstände, wie der besonderen Kleinheit der Perniciosaringe und ihrer Vorliebe für den Rand der Blutscheibe, schon in diesem Stadium eine ziemlich sichere Diagnose stellen können.

Die großen Ringe (Taf. I, Fig. 7—15) zeigen im allgemeinen denselben Aufbau wie die kleinen; Kern und Protoplasma haben an Volumen zugenommen, der ungefärbte Teil dagegen hat an Masse eher etwas verloren als gewonnen, verhält sich aber sonst wie bei den kleinen Ringen. Viele Kerne haben ihre Gestalt in mannigfacher Weise verändert und erscheinen wie eine Hantel oder ein Hufeisen oder aber auch ganz als Ring; ein oder mehrere Kernkörperchen sind oft deutlich ausgesprochen. Das Protoplasma hat die stärkste Zunahme erfahren; während es bei den kleinen Ringen so gedehnt war, daß es in unseren Präparaten wie ein schmaler Streif erschien, sehen wir es jetzt in ansehnlicher Masse die Vakuole umfassen und in vielen starken Armen über das Blutkörperchen sich ausbreiten. An entsprechenden Objekten ist es uns möglich, auf das schönste zu beobachten, wie der Parasit das Blutkörperchen am Rande umgreift, da uns seine jetzige Größe erlaubt, den auf der Oberfläche liegenden Teil von jenem auf der Unterfläche zu unterscheiden (Taf. I, Fig. 12). Diese Erscheinung und die an den gefärbten Präparaten scharf hervortretenden Konturen zwischen Substanz des Parasiten einerseits und Blutkörperchen andererseits (Taf. I, Fig. 10—13) beweisen uns, daß der Parasit noch immer dem Blutkörperchen aufliegt.

Wenden wir jetzt unsere Aufmerksamkeit dem roten Blutkörperchen zu, so werden wir einige charakteristische Veränderungen gewahr,

welche wir bei den kleinen Ringen vergeblich suchen. Die von Parasiten bewohnten Blutscheiben zeigen häufig mehr oder weniger starke Schrumpfungserscheinungen, Stechapfel- und Maulbeerformen, während die nicht infizierten Blutkörperchen gut erhalten sind; ferner hat die ganze Substanz der befallenen Blutscheiben einen leichteren oder stärkeren rötlichen Farbenton angenommen, der sie in auffälliger Weise aus ihrer Umgebung heraushebt. Als Ursache dieses Farbentones erkennen wir bei sehr intensiven Färbungen — wie ich sie besonders mit Methylenblau, welchem Kali caustic. zugesetzt ist, erhalte — feinste rote Pünktchen, welche das rote Blutkörperchen vollkommen und gleichmäßig erfüllen und welche sowohl in den infizierten wie auch in den normalen Blutscheiben — in ersteren gröber und intensiver gefärbt, in letzteren schwächer — vorhanden sind; ich betrachte diese Pünktchen als gefärbte Teile des Blutkörperchenstromas [1]) (Taf. III, Fig. 7, 11, 12, 13).

Endlich aber fällt uns in diesen infizierten Blutzellen eine Anzahl intensiv roter Flecken auf, welche Schüffner in der genannten Arbeit schon beschrieben hat und welche sich bei genauerer Betrachtung als Punkte, feinste Ringelchen, als Schleifen oder Streifen entpuppen; vorherrschend sind die kleinen Ringelchen. Die Anzahl dieser Flecken ist in den verschiedenen Blutkörperchen verschieden groß; neben solchen, die nur 1, 2 oder mehr tragen, finden wir andere, welche reichlich damit ausgestattet sind; immer jedoch ist ihre Zahl eine leicht zählbare. Der Anordnung der Flecken fehlt jede Regelmäßigkeit, und ihre Größe ist eine ziemlich variable; wir finden kleinste Punkte neben dickeren, kleine Ringelchen neben solchen, die fast 1 μ Durchmesser haben, kurze Schleifen neben langen. Wenn ich noch bemerke, daß die Flecken stets auftreten, in allen Blutkörperchen, die von den größeren Ringformen der Perniciosaparasiten bewohnt sind — bis auf eine bestimmte Ausnahme, von welcher später die Rede sein wird — so habe ich alles gesagt, was über das Phänomen zu sagen ist, und ich kann mich der Beantwortung der Frage zuwenden: Wie entstehen die Flecken und als was haben wir sie aufzufassen? Von vornherein ist es wohl zweifellos, daß die Flecken in einem gewissen Zusammenhange stehen mit den Parasiten; denn während an den von kleinen Ringen bewohnten Blutkörperchen nichts zu beobachten auffiel, sehen wir die Flecken erscheinen, sobald die Parasiten größer werden, und zwar sind sie spärlicher oder zahlreicher auf einem Blutkörperchen, je nachdem der Parasit kleiner oder größer ist; daraus geht hervor, daß die Flecken nicht auf einmal auftauchen, sondern einer nach dem anderen entstehen: ein ganz prinzipieller Unterschied von der Entstehung der Tüpfelung beim Tertianaparasiten [2]). Wir

1) Auf diese Erscheinung und ihren Zusammenhang mit den Tertianatüpfeln hoffe ich in einem besonderen Aufsatze zurückzukommen.

2) Maurer, G., Die Tüpfelung der Wirtszelle des Tertianaparasiten. (Centralbl. f. Bakt. etc. Abt. I. Bd. XXVIII. 1900. No. 4/5.) Diese Arbeit bespricht W. B. Leishman in einem Artikel: The application of Romanowsky's stain in malaria. (Brit. med. Journ. 1901. March 16. No. 2098); dabei sagt er: „Maurer legt Nachdruck auf die Thatsache, daß die Tüpfel, von dem Augenblicke ihres ersten Auftretens ab nur an Größe und nicht an Zahl zunehmen; aber in den in Fig. 5—12 abgebildeten Formen — welche ein sehr junges Stadium des Tertianaparasiten zeigen und welche alle von demselben Falle stammen — wird man bemerken, daß die Tüpfel sowohl bedeutender sind an Masse als auch geringer an Zahl, wie jene eines anderen Falles (Fig. 13—23), in dem die Parasiten ein höheres Entwickelungsstadium erreicht hatten." Demgegenüber

müssen also irgend eine Brücke zwischen Parasiten und Flecken zu entdecken suchen, und eine unter diesem Gesichtspunkte vorgenommene Durchmusterung der Präparate lehrt, daß diese auch zu finden ist, wenn wir unser Augenmerk weniger den Formen zuwenden, die im Ruhezustande fixiert sind, als vielmehr jenen, in welchen der Tod das Protoplasma mitten in seiner Bewegung gelähmt hat. Hier können wir am Ende der bläulich gefärbten Arme vielfach Anschwellungen bemerken, welche in direkter Verbindung stehen mit roten Flecken des Blutkörperchens (Taf. I, Fig. 7, 8, 10); kleinere, oft feinste rote Punkte liegen der Peripherie des Parasiten an (Taf. I, Fig. 12, 13); schleifenförmige Ausläufer des Protoplasmas umschnüren Stückchen des roten Blutkörperchens, sind gleichsam im Begriffe, diese Stückchen ab- oder auszuquetschen. Hier und da erscheint das Protoplasma wie aufgelöst in ein Gewirr von polypenartig sich ausstreckenden Armen und Schleifen. die besetzt sind mit jenen rotgefärbten Flecken. Für alle diese Erscheinungen giebt es nur eine genügende Erklärung: wir müssen die beschriebenen, in unseren Präparaten rotgefärbten Punkte, Ringelchen und Striche betrachten als Substanzveränderungen resp. -verluste auf der Oberfläche des Erythrocyten, die eine Folge sind von Angriffen des Parasiten, welche dieser unternimmt, um sich an seinem Träger festzuhalten und sich Nahrung zu verschaffen. Der Parasit, welcher im Beginne seiner Existenz alle Nahrung aus dem Plasma des Blutes bezieht (Vakuole), hält sich später an das rote Blutkörperchen, dem er sich zu diesem Zwecke angeheftet hat; so lange er klein ist, sind seine Ansprüche gering und die Verletzungen, die er seinem Wirte beibringt, dementsprechend unbedeutend und für uns nicht sichtbar; mit seinem Wachstume ändert sich beides und die letzteren werden so eingreifend, daß wir imstande sind, sie durch Färbung nachzuweisen. Gleichen Schritt mit der Verletzung seines Wirtes hält das Auftreten von Pigment im Parasiten; während wir es bei den kleinen Ringen vermissen, tritt es uns in den größeren Ringen regelmäßig entgegen in Form feinster Körnchen, die freilich in unseren Präparaten sehr oft durch die Färbung verdeckt werden, in einzelnen Parasiten aber doch deutlich zum Ausdruck kommen (Taf. I, Fig. 10—14).

Es muß nachdrücklich hervorgehoben werden, das das Auftreten der Flecken auf der Wirtszelle des Perniciosaparasiten eine durchaus regelmäßige und unzweideutige Erscheinung ist, und daß wir durch ihr Vorhandensein allein ohne weiteres in den Stand gesetzt werden, die Diagnose „Malaria perniciosa“ zu stellen.

Bei Perniciosakranken, die mit Chinin behandelt werden, hier und da auch bei solchen, denen dieses Specificum noch nicht verabreicht wurde, stoßen wir manchmal auf gefleckte Blutkörperchen ohne Parasiten (Taf. I, Fig. 14). Die Flecken sind dabei aber so typisch, daß wir mit aller Sicherheit für diese Fälle annehmen dürfen, daß der ehemalige Bewohner des Blutkörperchens entweder abgestorben

---

möchte ich hier kurz betonen, daß alle von mir untersuchten Fälle von Malaria tert. immer dieselben Resultate ergaben, und daß ich auch heute noch wiederholen kann, was ich in der von Leishman besprochenen Arbeit sagte, „sie (die Tertianatüpfel) erscheinen von Anfang an, gleichmäßig durch die ganze Blutscheibe verteilt, als sehr feine Tüpfel, sie wachsen mit dem Größerwerden des Blutkörperchens resp. mit dem des Parasiten nicht an Zahl, sondern nur an Masse“.

und abgefallen ist oder aus einem anderen Grunde sein Opfer verlassen hat — diese Erscheinung ist uns ein ausgezeichneter Beweis für das Leben der großen Ringe auf den Blutkörperchen. Es bleibt jetzt nur noch übrig, die Frage zu beantworten, warum sich die Substanzveränderungen der Blutscheiben rot färben.

Wie wir im Verlaufe dieser Abhandlung noch erfahren werden, hat die Romanowsky'sche Färbung das besondere Vermögen, solche Teile des roten Blutkörperchens, die ihren Farbstoff, das Hämoglobin, verloren haben, rot zu färben; im Bereiche der Flecken muß also das Blutkörperchen seines Hämoglobins verlustig gegangen sein, der Parasit hat diese Stellen sozusagen ausgesogen, und es ist ganz gut möglich, daß es sich bei den Flecken nicht um Substanzverluste, sondern allein um Hämoglobinverluste handelt, weshalb ich oben — um nichts zu präjudizieren — sagte: Substanzveränderungen.

Mit den großen Ringen hat die erste Entwickelungsphase des Perniciosaparasiten ihren Abschluß erreicht; er hat bis dahin auf der Oberfläche des Erythrocyten gelebt und war im peripheren Blute leicht zu finden; beides ändert sich in der Folge: der Parasit verschwindet aus der peripheren Blutbahn und wohnt nicht mehr, wie wir sehen werden, auf, sondern im roten Blutkörperchen. Ich werde deshalb den Perniciosaparasiten während der nun folgenden zweiten Entwickelungsphase den internen Schizonten nennen zum Unterschiede von dem Stadium der Ringe, in welchem man ihn als externen Schizonten bezeichnen könnte. Bis zu den großen Ringen läßt sich die Entwickelung des Perniciosaparasiten im peripheren Blute leicht verfolgen; haben die Schizonten aber diese Entwickelungsstufe erreicht, so verschwinden sie aus den peripheren Gefäßbezirken und ziehen sich in die Kapillaren der inneren Organe zurück. Es gelingt uns dann nur noch bei fleißigem Suchen, im peripheren Blute einzelne reifere Formen und Teilungsfiguren zu entdecken, die durch irgend einen Zufall aus ihrem Schlupfwinkel in den inneren Organen weggerissen und in die Cirkulation geschleudert wurden; häufiger, ja sogar regelmäßig, sind solche Funde in jenen schweren, bei uns seltenen Erkrankungsfällen, wo das Blut so mit Parasiten überfüllt ist, daß 20—50 Proz. aller Blutkörperchen infiziert sind. Für die auffällige Thatsache, daß alle Perniciosaparasiten bis auf wenige Ausnahmen ihre zweite Entwickelungsphase bis zur Teilung in den inneren Organen durchmachen, ist es nicht leicht, eine Erklärung zu finden; ich habe mir diese Eigentümlichkeit in folgender Weise zurechtzulegen versucht: wenn der Perniciosaparasit sich zum Einwandern in seinen Wirt anschickt, hat er, im Gegensatze zu den Parasiten der Tertiana und Quartana, welche nur sehr kurze Zeit extern leben, schon eine beträchtliche Größe erreicht; er muß daher bei seinem Vorhaben größere Schwierigkeiten überwinden, als jene, wahrscheinlich so große, daß ihm das Eindringen in seinen Wirt im strömenden Blute nicht gelingt. Aus diesem Grunde — vielleicht auch noch aus anderen Ursachen — sucht der Parasit die von ihm besetzte Blutscheibe an Plätzen, die dazu günstig sind, festzuhalten; die beste Gelegenheit hierfür bieten die Kapillaren der inneren Organe, wo die Strömungsgeschwindigkeit des Blutes stark verringert ist: indem der Parasit an dem Blutkörperchen festgeklammert bleibt, wird er trachten, an der Kapillarwand einen Halt zu gewinnen, dadurch das Blutkörperchen zum Stillstand bringen und an die Gefäßwand festheften. Auf diese Weise kommen mehrere infizierte Blutscheiben nebeneinander zu sitzen, indem das erste den

folgenden die Niederlassung erleichtert. Kleine resp. kurze Kapillaren werden durch solche Ansiedelungen schließlich vollkommen verlegt und aus der Cirkulation ausgeschaltet, es kommt in ihnen zur Blutstase; innerhalb dieser Stasen liegen alle Blutkörperchen unbeweglich fixiert, die Parasiten brauchen ihre Wirte nicht mehr aktiv festzuhalten und können das Eindringen in deren Inneres — den Aktus, welcher ihre zweite Entwickelungsphase einleitet — bequem vollziehen. Ist die Entwickelung der Parasiten bis zur Teilung gediehen, so zerfallen mit dem Auseinanderweichen der Merozoiten deren Wirtszellen, die das Hemmnis für die Cirkulation abgegeben hatten, und unter der Einwirkung des Blutstromes, vielleicht auch durch die Thätigkeit der jungen Parasiten selbst, wird die Stase aufgehoben; mit dem Blutstrome gelangt die junge Brut in den Körperkreislauf, in die Peripherie und zwar meist schon wieder als Bewohner von roten Blutkörperchen. Der junge Parasit hat ja an seinem Geburtsorte bei der Wiedereröffnung der verlegten Gefäßbezirke die beste Gelegenheit, sich an eines der langsam passierenden Blutkörperchen festzusetzen, und wir finden bekanntlich gerade bei der Perniciosa häufig Blutscheiben mit mehreren bis zu 6 Parasiten besetzt. Es bedarf keiner besonderen Erklärung, daß das eine oder andere Blutkörperchen, nachdem der Parasit in seinen Leib eingedrungen ist, den Halt in den Kapillaren verlieren und in der Peripherie erscheinen kann, und daß dies Vorkommnis in direktem Verhältnisse stehen muß zu der Anzahl der infizierten Blutscheiben.

Die internen Schizonten (Taf. I, Fig. 16—19). Es ist sehr leicht, die älteren Formen der Perniciosaparasiten als solche zu erkennen und festzustellen, daß der Parasit in der That im Inneren seines Wirtes wohnt. Die jüngsten internen Schizonten haben die Form einer runden oder ovalen Scheibe mit einem Durchmesser halb so groß als der eines roten Blutkörperchens; der Kern ist sehr groß geworden und bildet eine dichte, rotgefärbte Masse; das Protoplasma hat ebenfalls an Volumen gewonnen, seine Beweglichkeit muß aber abgenommen haben, da von Ausläufern oder Verzweigungen keine Spur mehr zu beobachten ist. Der ungefärbte Teil, die Vakuole, ist vollständig verschwunden resp. aufgebraucht. Die auffallendste Neuerung in der Erscheinung des Parasiten bildet das Pigment; während wir dies in den großen Ringen nur erkennen konnten, wenn es sehr reichlich vorhanden war oder wenn wir sehr zart färbten, tritt es uns bei den internen Schizonten plötzlich als ansehnliche Masse, zu einem oder mehreren Klumpen zusammengeballt, im Leibe des Protoplasmas entgegen. Die Abgrenzung des Parasiten gegen die Substanz des roten Blutkörperchens ist nicht mehr so scharf, wie wir es bei den großen Ringen fanden; die Grenzlinie, welche die großen externen Parasiten so auffallend umrandet, besteht nicht mehr und die Flecken liegen vielfach über das Protoplasma des Parasiten ausgebreitet, diesen überdeckend (Taf. I, Fig. 17); in intensiv gefärbten Präparaten erhält ferner das ganze Protoplasma einen mehr oder weniger rötlichen Ton, weil die den Parasiten umschließende Blutkörperchenhülle mitgefärbt wird. Alle diese Zeichen sprechen dafür, daß der Parasit nicht mehr auf der Oberfläche des Blutkörperchens, sondern in dessen Inneren lebt.

Da von nun an die Masse des Pigmentes des internen Schizonten nicht mehr größer wird, so können wir sagen: Der Perniciosaparasit bildet den größten Teil seines Pigmentes während des Eindringens in seinen Wirt und er sammelt es,

bevor die Teilung des Kernes begonnen hat, im Gegensatze zum Verhalten der Quartana- und Tertianaparasiten. Dieser Vorgang, der eine ganz regelmäßige Erscheinung ist, bedeutet das erste Symptom der beginnenden Teilung und ist als Hauptcharakteristicum der älteren schizogonetischen Formen des Perniciosaparasiten, d. h. der internen Schizonten anzusprechen.

Ohne daß der Parasit bedeutend größer wird, beginnt der Kern sich zu teilen (Taf. I, Fig. 18), und schließlich haben wir das Endprodukt des schizogonetischen Lebenslaufes, die Teilungsfigur vor uns (Taf. I, Fig. 19). In dieser liegt der Pigmentklumpen bald in der Mitte, bald am Rande des Blutkörperchens, umgeben von 10—15 Merozoiten, welche aus einem verhältnismäßig großen Kerne und kleinem Protoplasmaleibe bestehen. Das Blutkörperchen, dessen Kontur noch gut erhalten ist, wird niemals vollständig von der Parasitenbrut eingenommen; stets bleibt noch ein freier Rand übrig, der deutlich einzelne Flecken erkennen läßt. Durch das Platzen der Blutkörperchenhülle, welche die jungen Parasiten bis jetzt umschlossen hat, werden diese frei und beginnen den beschriebenen Cyklus aufs neue.

Die Gameten. Nicht immer jedoch schlagen die Merozoiten den Weg zur Schizogonie ein; unter gewissen Umständen können sie einen anderen wählen, dessen Endziel die Gameten, die Halbmonde sind. Ueber deren Entstehung hat man sich bisher kein rechtes Bild machen können; man begegnet meist der Ansicht, daß sie Abkömmlinge der reiferen Schizonten seien. Meine Untersuchungen ergeben aber, daß die Gameten einen eigenen Entwickelungsgang einschlagen; der Punkt, an dem sich ihr Weg von dem der Schizonten scheidet, liegt ganz nahe der Grenze, welche den Uebergang bildet von den kleinen Ringen zu den großen, und zwar nehme ich das an, weil wir an der Wirtszelle der Halbmondreihe, speziell bei deren Jugendformen, die Flecken vermissen; sie machen jene Ausnahme, von welcher ich oben sprach.

Bei Perniciosakranken, die nicht mit Chinin behandelt sind und in deren Blut neben kleinen und großen Ringen auch Halbmonde vorkommen, stoßen wir nicht gar so selten auf Blutkörperchen, welche zwar eine größere Ringform beherbergen, aber trotzdem keine Spur von Flecken aufweisen; eine genaue Betrachtung läßt uns an dem Parasiten selbst noch andere Eigentümlichkeiten gewahr werden. Die Figuren 20—22 auf Taf. II zeigen das sehr deutlich: der Parasit stellt eine kreisrunde Scheibe dar von der Größe einer mittleren Ringform, in welcher der Kern und das Protoplasma die äußere Begrenzung bilden und die Nährflüssigkeit wie ein Band umfassen. Das Eigenartige an dem Bilde ist der Umstand, daß dieses Band nicht nur kreisrund, sondern auch überall gleich breit ist; der Kern ragt weder nach innen noch nach außen über die Kreislinie hervor und erscheint mit dem Protoplasma zusammen wie aus einem Stück gegossen. Diese Erscheinung allein könnte uns annehmen lassen, daß der Parasit nicht mehr auf, sondern in dem Blutkörperchen wohnt, wo der Druck der Flüssigkeitsvakuole im Parasitenleibe und der Druck der Blutkörperchensubstanz von außen her den Kern und das Protoplasma zwingen, die beschriebene Gestalt anzunehmen. Als weitere Stützen unserer Annahme kommen hinzu: das Verschwinden der scharfen,

feinen Konturlinie, welche die externen Parasiten stets gegen das Blutkörperchen abgrenzt, und in stark gefärbten Präparaten ein leichtroter Farbenton der Vakuole, der nichts anderes sein kann, als gefärbtes Blutkörperchenstroma, das über den Parasiten hinzieht. Bei intensiver Färbung macht sich schon in diesem frühen Stadium ein weiteres Phänomen geltend, das in Verbindung mit dem Fehlen der Flecken und der charakteristischen Bandform das Haupterkennungszeichen der jüngsten Gameten bildet. Es ist dies ein dicker, roter Ring, der den Parasiten wallartig umschließt und von seiner Umgebung scheidet, und der sich von da ab bei allen Stadien der Halbmondreihe nachweisen läßt (Taf. II, Fig. 22—25).

Eine stärkere Pigmentbildung ist in den jüngsten Gameten noch nicht zu beobachten; hier und da finden wir feinste Pigmentstäubchen (Taf. II, Fig. 21).

Ist der Parasit etwas älter, so bietet er ein Bild, wie es Fig. 23 auf Taf. II zeigt: der rote Ring ist sehr stark ausgebildet; der Kern hat sich bedeutend vergrößert, aufgelockert und ist nicht mehr so auffallend wie früher vom Protoplasma differenziert; die Vakuole ist verschwunden resp. im Parasitenleibe aufgegangen; dafür ist als neuer Bestandteil grobkörniges Pigment aufgetreten. In einem noch weiteren Stadium geht die strenge Ringform des Gameten verloren (Taf. II, Fig. 24, 25), er wird mehr oval oder spindelförmig, erstreckt sich auch häufig wie ein breiter Streif quer durch das Blutkörperchen, so daß er Aehnlichkeit bekommt mit der sogenannten Bandform des Quartanaparasiten; der Kern ist stets stark rot gefärbt und liegt als mehr oder weniger lockerer Knäuel im Protoplasma, umlagert von reichlichem grobkörnigen oder stäbchenförmigen Pigment; die Umrandung des Gameten wird auch hier durch einen ziemlich breiten, rotgefärbten Saum gebildet. Ich betone nochmals, daß der freie Teil des Blutkörperchens bei allen diesen Formen stets vollkommen fleckenlos ist.

Der Gamet verhält sich während seines Wachstums sehr passiv, er führt keine sichtbaren Bewegungen aus, ja er verharrt an dem einmal in der Blutscheibe eingenommenen Platze für immer, indem er mit dem Größerwerden die ihn umschließende Zelle einfach ausdehnt. Wenn der Parasit anfängt, sich der charakteristischen Gestalt des Endproduktes dieser Entwickelungsreihe, der Halbmondform zu nähern, nimmt er $^1/_2$ bis $^3/_4$ des Volumens seines Wirtes ein. An den ausgewachsenen Halbmonden (Taf. II, Fig. 26—31) lassen sich 2 voneinander verschiedene Formen unterscheiden, in welchen wir jetzt geschlechtlich differenzierte Individuen des Perniciosaparasiten erblicken mit der Bestimmung, das Fortbestehen der Art in einem anderen Wirte, den Mücken, zu ermöglichen. Welche Einflüsse jedoch auf die geschlechtliche Differenzierung der jungen Gameten maßgebend sind oder welche Erscheinung als erste Aeußerung einer solchen anzusehen wäre, ist noch nicht erforscht.

Nur der Makrogamet, das weibliche Individuum (Taf. II, Fig. 26, 27 und 29) hat sofort, wenn seine Ausbildung vollendet ist, Aehnlichkeit mit einem Halbmonde; er ist länglich, schlank, leicht gekrümmt und besitzt einen großen, offenbar sehr wasserreichen und daher nur schwach bläulich gefärbten Protoplasmakörper; in der Mitte seines Leibes, seltener einem seiner beiden Pole genähert, liegt der rote, aus dicht geschlungenen Fäden bestehende, runde Kern, dessen

Durchmesser ungefähr $^1/_2$—$^3/_4$ der Breite des Halbmondes entspricht; statt eines Kernes findet man hier und da auch deren zwei oder selbst drei. Das Pigment ist in groben Körnern oder Stäbchen, sehr oft in der Form eines Kranzes, um den Kern gelagert und wird nur vereinzelt neben ihm liegend getroffen.

Der männliche Gamet, der Mikrogametocyt (Taf. II, Fig. 28 und 30) gleicht zunächst weniger einem Halbmonde; er ist kürzer und breiter als der weibliche und könnte besser als bohnen- oder nierenförmig beschrieben werden. Der größte Teil seines Inneren wird eingenommen von einem Kerne, der aus äußerst locker geschlungenen, wirr durcheinander liegenden oder in deutlich getrennten Zügen angeordneten Fäden zusammengesetzt ist. Das Protoplasma umfaßt den Kern als schmaler, nur an den beiden Polen etwas breiter werdender Saum. Das Pigment besteht ebenfalls aus groben Körnern und Stäbchen und ist unregelmäßig um den Kern gruppiert oder über ihn ausgestreut; einen ausschlaggebenden Unterschied zwischen der Form des Pigmentes bei den Makrogameten und den Mikrogametocyten habe ich — im Gegensatze zur herrschenden Ansicht — niemals finden können; es ist selbstverständlich, daß bei den letzteren die Pigmentkörnchen oft mehr zerstreut liegen, da der größere Kern sie mehr auseinander drängen kann.

Beide Geschlechter sind stets umgeben von einer mehr oder weniger dicken Hülle, dem Reste der Wirtszelle; diese Hülle liegt dem Protoplasmaleibe fest an und ist in unseren Präparaten sehr intensiv rot gefärbt; sie ist am massigsten dort, wo der Blutkörperchenrest dem Parasiten anliegt, während sie über die Ober- und Unterfläche des Gametenleibes als sehr dünne Membran hinzieht; doch erscheint in dieser letzteren bei starker Färbung ein Netzwerk von breiten Strängen (Taf. II, Fig. 26), in dem wir wohl die gedehnte und veränderte Gerüstsubstanz des Blutkörperchens zu suchen haben. Bei jungen Halbmonden, d. h. solchen, die eben ausgewachsen sind, schließt diese Hülle nach außen nur selten mit scharfen Konturen ab (Taf. II, Fig. 30); meistens finden sich auf der Konvexseite niedere Hervorragungen von buckelförmiger, höckeriger oder auch zackiger Gestalt, während sich auf der konkaven Seite von einem Horne des Halbmondes nach dem anderen ein zierlicher, feiner Kreisbogen spannt, welcher seinerseits wieder von kleinen, perlenartig gereihten Knötchen besetzt sein kann (Taf. II, Fig. 27, 29); doch kommt noch eine ganze Reihe anderer Bildungen des Blutkörperchenrestes zu Gesicht, die besser veranschaulicht werden durch die Figuren als durch Beschreibungen; besonders aufmerksam machen will ich auf Fig. 29, wo wir auch *auf* dem Gameten eine stärkere knotenförmige Färbung der Hülle erblicken, um davor zu warnen, solche Knoten für Gametenkerne zu halten.

Kreisen die Gameten längere Zeit im Blute, so schleifen sich die beschriebenen Hervorragungen etc. der Hülle alle ab und die Halbmonde erscheinen allseitig umschlossen von einer feinen, eng anliegenden Membran, in welcher wir — wie schon erwähnt — eine netzförmige Struktur nachweisen können. Diese Membran, der letzte Rest der Blutkörperchenhülle, ist bei allen Gameten der Perniciosa vorhanden — der Parasit sprengt sie erst, wenn er sich zur Geißelbildung anschickt — und wir werden sie nicht mit Unrecht als *Kapsel des Halbmondes* ansprechen.

Ich erwähnte schon, daß um den jungen Gameten, bald nachdem

wir ihn in der Blutscheibe finden, ein roter Ring entsteht, und wir konnten feststellen, daß dieser Ring oder Wall von da ab als ein typisches Zeichen der Halbmondformen stets vorhanden ist; er scheidet den Parasiten von der übrigen, unversehrten Blutkörperchensubstanz; letztere nimmt mit dem Wachstume des Gameten immer mehr ab, bis sie fast vollständig verschwunden ist und nur noch in wenigen Resten an der Kapsel des Parasiten, dem ehemaligen Ringe, hängt. Weder die Kapsel des Halbmondes noch der an ihr hängende Restkörper enthalten noch eine Spur von Hämoglobin, was daraus hervorgeht, daß sie mit Eosin nicht zu färben sind; der Halbmond hat also bei seinem Wachstume das Blutkörperchen nicht „aufgezehrt", sondern er hat es nur „ausgesogen", er hat es seines Hämoglobins beraubt und sich aus dem unverbrauchten Stroma die Kapsel gebildet. Der rote Ring bedeutet den Anfang dieses Prozesses, er stellt nichts Anderes dar, als die Wand der Höhle, in welcher der junge Gamet liegt; sie färbt sich rot, weil der Parasit das Hämoglobin ausgezogen hat, ebenso wie sich zum Schlusse die ganze Hülle des Gameten intensiv rot färbt, wenn sie keinen Blutfarbstoff mehr enthält. Derselbe Grund ist maßgebend für die Färbung der Flecken der Wirtszelle der großen Ringe, wie ich das früher auseinandersetzte; sicherlich muß aber sowohl hier als bei der Färbung der Halbmondkapsel außer dem Verschwinden des Hämoglobins noch ein anderes Moment mitwirken. In Blutpräparaten nämlich, die wir nach Mannaberg-Schüffner's Härtemethode vorbehandelt haben, in welchen also alles Hämoglobin ausgelaugt ist, nehmen wohl alle Erythrocyten einen rötlichen Farbenton an und bestätigen damit unseren obigen Satz; die Perniciosaflecken sind jedoch viel intensiver gefärbt als das Stroma des Blutkörperchens, in ihrem Bereiche muß also die Blutkörperchensubstanz nicht nur ihr Hämoglobin verloren, sie muß auch durch den Parasiten eine weitere Veränderung erlitten haben, was ich oben durch die Bezeichnung Substanzverlust resp. Substanzveränderung andeuten wollte. Die Neigung des hämoglobinfreien Stromas zur Rotfärbung erfährt demnach durch den Parasiten eine ganz bedeutende Steigerung, die wir als spezifische Wirkung des Parasiten auffassen müssen und auf dieselbe Stufe zu stellen haben, wie die Wirkung des Tertianaparasiten auf das Stroma seiner Wirtszelle.

Das Ausbleiben einer Ring- oder Wallbildung resp. einer Färbung der Höhlenwand des internen Schizonten können wir uns jetzt leicht begreiflich machen, wenn wir annehmen, daß dieser seinen Wirt wirklich „auffrißt", Stroma sowohl als Hämoglobin; er ist deshalb nicht umgeben von farbstofffreier Blutkörperchensubstanz, die sich bei der Romanowsky'schen Färbung rot färben müßte.

Aus den beschriebenen Beobachtungen glaube ich nun berechtigt zu sein, folgende Schlüsse zu ziehen:

1) Die Gameten des Perniciosaparasiten entstehen, wie die schizogonetischen Formen, aus den Merozoiten; doch während die Schizonten einen großen Teil ihrer Entwickelungszeit auf der Ober- resp. Außenfläche des Blutkörperchens zubringen, dringen diejenigen kleinen Ringe, die sich zu Gameten umbilden, frühzeitig in das Innere der Blutscheibe ein. Hier wachsen sie heran, indem sie an dem einmal eingenommenen Platze verharren und und sich aus dem Leibe ihres Wirtes eine Art Kapsel bilden; die Parasiten verwenden zu letzterem Zwecke das Blut-

körperchenstroma, welches wir bei der Mehrzahl der Gameten als hämoglobinlosen Restkörper in mancherlei, oft noch gut an das ehemalige Blutkörperchen erinnernden Formen an dem Parasiten haften sehen.

2) Die beiden Entwickelungsformen lassen sich schon in früher Jugend gut auseinanderhalten; ebenso wie die Flecken der Wirtszelle der größeren Ringe uns aufs bestimmteste die Parasiten als *Laverania malariae* charakterisieren, ein ebenso gutes Mittel ist uns das Fehlen der Flecken zur Erkennung der Jugendformen der Gameten im Blute von Perniciosakranken.

3) Aus der Verschiedenheit der Lebensbedingungen der jungen Parasiten ist auch die Verschiedenheit ihrer Pigmentbildung zu erklären; während der auf dem Blutkörperchen lebende Schizont die Nahrung von seinem Wirte in sehr geringen Portionen bezieht und deshalb nur wenig feines Pigment bildet, ist der junge Gamet, der in der Blutzelle lebt, von Nahrungssubstanz umgeben, er kann sich bequem mit dem Nötigen versorgen und bildet demgemäß reichlich Pigment.

Die Gameten erscheinen im Blute unserer Malariakranken immer erst einige Zeit nach dem Beginne des Fiebers, bei dem einen früher, bei dem anderen später; bei dritten endlich kann ihre Bildung fast ganz ausbleiben. Während sich also die Parasiten anfangs alle durch Schizogonie, d. h. durch einfache Teilung, weiter entwickeln, tauchen auf einmal geschlechtlich differenzierte Individuen auf, welche den ersten Schritt zur Sporogonie bezeichnen. Diese Erscheinung des Generationswechsels, welche in analoger Weise auch bei anderen Sporozoenarten vorkommt, wird dadurch erklärt, daß die dem Parasiten anfangs so günstigen Lebensbedingungen in seinem Medium eine Verschlechterung erfahren, indem im Blute des Kranken Stoffe erscheinen, welche auf die jungen Schizonten schädigend einwirken und welche wahrscheinlich von dem erkrankten Organismus selbst als Schutzmittel gegen die Infektion produziert werden. Um der Gefahr, die seiner Existenz droht, zu entgehen, verzichtet der junge Schizont auf seinen gewöhnlichen Entwickelungsgang und wandelt sich in Formen um, welche widerstandsfähiger sind gegen äußere Schädlichkeiten; er wird Gamet. Als Schizont lebt der Perniciosaparasit, wie wir gesehen haben, längere Zeit auf dem roten Blutkörperchen und ist allen feindlichen Stoffen, die im Blutplasma kreisen, ausgesetzt, da er seine Nahrung anfangs vollständig und später, wenn er beginnt, von seinem Wirte zu zehren, auch noch großenteils aus dem Blutserum bezieht; erscheinen nun in letzterem Stoffe, welche den jungen Schizonten schädlich sind, so giebt ein Teil derselben das Leben auf der Oberfläche der Blutscheibe auf und flüchtet in deren Leib. Hier umschließt und schützt ihn die Wirtszelle allseitig; doch der junge Gamet ist damit noch nicht zufrieden, sondern trachtet, seine Hülle zu einer festeren Kapsel zu verstärken, indem er das ihn umgebende Blutkörperchenstroma selbst nicht angreift und nur das darin enthaltene Hämoglobin in sich aufnimmt und verzehrt.

Der Perniciosaparasit sucht nun nicht allein den Schutzstoffen des Organismus durch Generationswechsel auszuweichen, er thut dasselbe gegenüber dem Chinin, das wir dem Kranken zuführen; sehr oft können wir nämlich das Auftreten von zahlreichen Halbmonden konstatieren, sobald wir mit der Darreichung von Chinin beginnen; dabei dürfen wir jedoch nicht übersehen, daß dies nur bei Kranken der Fall ist, die schon mehrere Fieberanfälle gehabt haben und in deren Blut schon Neigung zur Halbmondbildung bestand; letztere bleibt vollständig aus, wenn wir

die allerersten Fieber rationell mit Chinin behandeln können. Ich habe einige Male Gelegenheit gehabt, Malaria perniciosa bei Europäern zu beobachten, die meine Hilfe einholten beim ersten Ansteigen der Temperatur und die vorher niemals an Malaria gelitten hatten; aus den ersten Blutpräparaten konnte die Erkrankung regelmäßig erkannt werden, und die sofort eingeleitete Chininbehandlung heilte die Krankheit in wenigen Tagen: es kam weder zur Halbmondbildung noch später zu Recidiven. Die Halbmonde können als solche wahrscheinlich längere Zeit unverändert im Blute leben, ohne daß wir bis jetzt wüßten, welches ihre weiteren Schicksale sind. Es steht fest, daß bei Patienten, deren Blut ausschließlich Halbmonde beherbergt, von Zeit zu Zeit mehr oder weniger heftige Fieberanfälle auftreten, ohne daß irgend eine Regelmäßigkeit, ein „Typus“ dabei zu erkennen wäre. Untersuchen wir das Blut während solcher Perioden sehr aufmerksam, so werden wir stets mehr oder weniger zahlreiche kleine und große Ringe finden, welche sich in ihrem Aeußeren von dem aus Merozoiten sich entwickelnden Schizonten in nichts unterscheiden. Wenn nun tagelang vorher keine Schizonten, sondern nur Halbmonde im Blute gefunden werden konnten, wenn zugleich lange Zeit Chinin gegeben worden war, dem kein externer Schizont auf die Dauer widerstehen kann, so muß man notgedrungen annehmen, daß die plötzlich auftauchenden Schizonten nur aus den Halbmonden entstanden sein können, wenngleich man nicht imstande war, Thatsachen beizubringen, welche die Rolle der Gameten hierbei sofort erklärt hätten.

Es dürften daher die Beobachtungen, welche ich in 2 Fällen von Perniciosa gemacht habe, von Interesse sein, da sie geeignet sind, etwas Licht zu bringen in das Dunkel, welches bis jetzt das Schicksal der Halbmonde umgiebt. Vor 3 Jahren schon stieß ich bei einem Kranken mit schwerer Perniciosa, der in comatösem Zustande aufgenommen wurde und dessen Blut mit Parasiten und Halbmonden überschwemmt war, neben gewöhnlichen Teilungsfiguren auf eine Form, die mich sehr überraschte (Taf. II, Fig. 32); in dem nach Mannaberg-Schüffner's Färbemethode behandelten Präparate fanden sich um einen centralen, kompakten Pigmentklumpen 30 junge Merozoiten dicht gelagert; das Gebilde war anderthalbmal so groß als ein rotes Blutkörperchen, von einem solchen selbst war keine Spur mehr zu sehen. Daß ich es mit keiner gewöhnlichen Teilungsfigur eines Perniciosaparasiten zu thun hatte, war klar; ebensowenig konnte Tertiana oder Quartana vorliegen, und ich wagte schon damals, an einen sich teilenden Halbmond zu denken, trotzdem mir außer der angeführten Ueberlegung jede Brücke zu diesem Schlusse fehlte. Erst vor kurzem hatte ich das Glück, ein weiteres Glied in der Beweiskette zu finden. Ein Perniciosakranker bot bei der Aufnahme reichliche Ringformen in seinem Blute und daneben einzelne Halbmonde; das anfangs quotidiane Fieber nahm, da jeder medikamentöse Eingriff unterlassen wurde, bald remittierenden Charakter an, wobei stets kleine und große Ringe im Blute vorhanden waren und immer mehr Halbmonde auftraten; eine Chinineinspritzung brachte prompten Temperaturabfall und 12 Stunden nach der 2. Chinineinspritzung (1 g) waren alle Ringe bis auf ganz vereinzelte verschwunden, die Anzahl der Gameten jedoch war nicht verringert. Unter diesen letzteren befand sich nun ein Halbmond, der folgendes Bild aufwies (Taf. II, Fig. 31): die Kapsel war gut und stark ausgebildet, intensiv rot gefärbt, nach außen nur mit wenigen Zacken und Buckeln besetzt. Der Leib des Parasiten

enthielt einen central gelegenen, runden, kompakten Pigmentklumpen, so wie er nur schizogonetischen Formen eigen ist, die vor der Teilung stehen; neben ihm befand sich die rote Kernmasse etwas kleiner und kompakter als bei den männlichen Gameten, doch größer als bei den weiblichen, ungefähr $^1/_8$ des Gametenleibes einnehmend; der Kern hatte Himbeerform, d. h. er erschien aus vielen kleinen, ziemlich scharf abgeteilten, runden Körnern zusammengesetzt. Das Protoplasma war bläulich-rot gefärbt, sah durch das darüber gebreitete Kapselnetz marmoriert aus und hob sich nicht scharf vom Kerne ab. Das Verhalten des Kernes zusammen mit dem des Pigmentes, welches wir in dieser Anordnung nur in Teilungsfiguren des Perniciosaparasiten sehen, veranlaßt mich, die ganze Erscheinung aufzufassen als eine beginnende Teilung des Halbmondes, die frühe Vorstufe von dem Bilde, welches ich als fertige Teilungsform des Halbmondes beschrieben habe. Ich spreche daher die Vermutung aus, daß den Halbmonden neben der großen Bedeutung, welche sie als Gameten für die Weiterexistenz ihrer Art außerhalb des Menschen haben, im Blute der Kranken noch eine andere Rolle zukommt, nämlich die von Dauerformen, d. h. Formen, die der Parasit annimmt, um gewissen Schädlichkeiten zu entgehen, und die er so lange beibehält, bis die Gelegenheit zur Weiterentwickelung durch Teilung günstiger wird.

Ist somit einerseits das Erscheinen von Halbmonden als ein prognostisch günstiges Zeichen zu deuten insofern, als wir aus ihm die Gewißheit erlangen, daß der Organismus des Kranken gegen die Infektion schon Schutzkräfte ins Feld geführt hat, so ist doch andererseits der Patient nicht von seiner Malaria befreit und stets neuen Fieberattacken ausgesetzt, solange sich Halbmonde in seinem Blute befinden.

Wie lange der Halbmond als solcher im Blute leben kann, ob er nach einer bestimmten Zeit zu Grunde gehen muß, wenn er nicht vorher zur Teilung geschritten ist, oder ob alle Halbmonde vor ihrem Lebensende diesen Versuch machen: diese und andere Fragen sind noch unbeantwortet.

Versuchen wir jetzt, die klinischen Erscheinungen der Malaria perniciosa mit den hier niedergelegten Anschauungen zu konfrontieren, so wird uns dies gelingen, ohne daß wir gezwungen wären, den Thatsachen Gewalt anzuthun. Aus dem großen Symptomenkomplexe will ich jedoch nur einige Erscheinungen von besonderem Interesse herausgreifen, die bisher ätiologisch noch nicht vollständig aufgeklärt waren.

Unter den klinischen Zeichen aller Malariaerkrankungen steht das Fieber in erster Linie. Golgi hat den Fieberparoxysmus in Zusammenhang gebracht mit den Teilungsvorgängen der Parasiten: mit dem Bersten der die Plasmodien bis dahin umschließenden Blutkörperchen gelangen giftige Stoffwechselprodukte in den Kreislauf und veranlassen die Temperaturerhöhung. Ich möchte hinzufügen: diese Temperatursteigerung bleibt in stärkerem oder geringerem Grade bestehen, solange die jungen Parasiten frei oder auf der Außenseite der roten Blutscheibe, d. h. als externe Parasiten im Blute kreisen; haben sich die jungen Schizonten in das Innere der roten Blutkörperchen zurückgezogen, so verschwindet das Fieber und der Kranke fühlt sich gewöhnlich

ganz wohl, bis die nächste Teilung[1]) erfolgt. Die regelmäßigen Fieber und die Fieberpausen sind damit genügend erklärt und es bleibt für sie nur noch die Frage zu lösen, warum die einzelnen Anfälle in ganz gleichen Zeitintervallen erfolgen, welches Moment jenen merkwürdigen Rhythmus in die Entwickelung der Parasiten bringt, der z. B. bei einer Tertiana duplex die beiden Generationen einen genauen 24-stündigen Abstand voneinander finden läßt. Es dünkt mir wahrscheinlich, daß dabei die von Parasiten produzierten Giftstoffe eine gewisse Rolle spielen.

Anders liegen die Verhältnisse bei den Fiebern der Malaria perniciosa. Im Beginne der Erkrankung, bei den ersten Fiebern, ist der Typus sehr oft ein einfach tertianer, der jedoch sehr bald übergeht in die Form einer modifizierten Tertiana, wie sie als charakteristisch beschrieben wurde von den Italienern für ihren „malignen Tertianaparasiten“ und von Koch neuerdings für seine „Malaria tropica“; diese Kurve zeigt am 1. Tage plötzlichen Anstieg, gleichmäßige Fieberhöhe für mehrere Stunden, dann geringen Abfall und gegen das Ende des 1. Tages einen zweiten Anstieg, dem in der ersten Hälfte des 2. Tages ein Abfall zur Norm folgt und eine fieberfreie Zeit bis zum Wiederbeginn des Paroxysmus am 3. Tage. Besteht die Erkrankung weiter fort, ohne daß eingegriffen wird, so verschwindet auch dieser Typus sehr rasch und das Fieber wird unregelmäßig intermittierend, selten einmal für kurze Zeit remittierend, ja es könnte selbst hier und da als continua aufgefaßt werden, wenn man Fieberperioden, die sich 2—3 Tage auf gleicher Höhe halten und denen intermittierendes Fieber vorausgegangen ist und nachfolgt, diesen Namen zubilligen will. Läßt sich somit für die Perniciosa ein einheitlicher Fiebertypus unmöglich aufstellen, so muß doch die oben erwähnte Form der modifizierten Tertiana als charakteristisch für die ersten Fieberanfälle dieser Erkrankung, wo noch ein gewisser Rhythmus in der Sporulation herrscht, anerkannt werden.

Diesen seltsamen Fieberverlauf hat nun Mannaberg zu erklären gesucht durch die Annahme, daß die Sporulation der vorhandenen Körper nicht auf einmal, sondern schubweise erfolgt (Mannaberg l. c. p. 129); wenn ich auch bestätigen muß, daß einige Fälle auf diese Weise zu deuten sind, so glaube ich doch nicht, daß damit das Richtige getroffen wurde für die Erklärung des Typus im allgemeinen, sondern möchte die wahre Ursache in Folgendem sehen: der Teilungsvorgang der Parasiten löst die erste Fiebersteigerung aus und je nachdem dieser Prozeß bei den vorhandenen Schizonten mehr oder weniger gleichzeitig erfolgt, um so kürzer oder länger wird der Paroxysmus dauern. Bevor die Temperatur aber imstande ist, zur Norm zurückzukehren, kreisen eine solche Masse junger Keime, den Blutkörperchen nur außen angeheftet, im Blute, daß deren Stoffwechselprodukte imstande sind, die Körperwärme wieder ansteigen zu machen: es erfolgt der zweite Anstieg. Erst wenn die Mehrheit der jungen Generation in das Innere der Blutkörperchen eingedrungen ist, wenn deren Stoffwechselprodukte also nicht mehr frei ins Blut entleert, sondern in der Wirtszelle aufgestapelt werden, sinkt die Temperatur, um von neuem

---

1) Unter Teilung ist hier und im folgenden nicht der Prozeß der Kernteilung, sondern die Sporulation zu verstehen, d. h. die vollendete Teilung von Kern und Protoplasma des Muttertieres, welche unmittelbar gefolgt ist vom Platzen der Wirtshülle und Freiwerden der Merozoiten.

anzusteigen mit dem Freiwerden der Merozoiten. Die erste Temperatursenkung, der Pseudoabfall, würde also dem Zeitmoment entsprechen, wo die Teilungsprozesse abgelaufen sind und die Wirkung der aus den Teilungsformen entleerten Stoffwechselprodukte nachläßt, wo aber die Abfallstoffe der jungen Parasiten quantitativ noch nicht ausreichen, um das Fieber auf seiner Höhe zu erhalten.

Die Ursache für die Abweichungen von diesem Fieberverlaufe für die große Neigung der Perniciosa zu unregelmäßigen Fiebern ist wohl darin zu suchen, daß bei den Perniciosaparasiten jenes uns noch unbekannte Moment, welches den strengen Rhythmus der Tertiana- und Quartanafieber zustande bringt, fehlt; ich habe immer gefunden, daß sich bei der Perniciosa die Teilungsvorgänge über eine längere, oft sogar sehr große Zeitspanne hinziehen, ja daß sie in nicht seltenen Fällen, so z. B. bei Fiebern, die sich selbst überlassen blieben, ununterbrochen stattfinden, so daß man in allen Präparaten, welche in Zwischenräumen von 4 bis 6 Stunden genommen werden, kleinste Ringe findet. Das Fieber der Perniciosa wird auch viel seltener durch einen Schüttelfrost eingeleitet, was bei der gewöhnlichen Tertiana, wo die Teilung der Mehrzahl der Parasiten fast gleichzeitig erfolgt, beinahe die Regel ist.

Mit dem Parasitenbefunde im Blute zusammengestellt, erhalten wir folgende Perioden:

1) Fieberanstieg	Teilung; wenige kleine Ringe;
2) Pseudoabfall	Teilung beendet; viele kleine Ringe, einige große Ringe;
3) zweite Erhebung	viele große Ringe, wenige kleine;
4) Abfall zur Norm	wenige große Ringe;
5) fieberfreie Zeit	spärliche große und später kleine Ringe.

Die erste Periode dauert ungefähr 6—12, die zweite 6, die dritte 6—12 und die fünfte 6—12 Stunden; es vergehen also vom Beginne der Teilung bis zum Auftreten der großen Ringe 12—18 Stunden und bis zum Verschwinden der Ringe 24—30 Stunden; der zweite Anfall setzt ca. 48 Stunden nach dem Beginne des ersten ein. Wir können deshalb annehmen, daß die ganze Entwickelungszeit des Perniciosaparasiten 48 Stunden dauert, und daß er davon die eine Hälfte auf, die andere in dem Blutkörperchen zubringt.

Erfolgt im Beginne der Erkrankung die Teilung der Mehrzahl der Parasiten gleichzeitig innerhalb kurzer Zeit, so kann die Temperatur nach dem ersten Anstieg auch zur Norm abfallen, um sich erst wieder zu erheben beim Einsetzen des zweiten Anfalles, wenn die Zahl der im Blute kreisenden externen Schizonten nicht groß genug ist, daß ihre Abfallstoffe imstande wären, eine neuerliche Temperaturerhöhung zu bewirken; in ersterem Falle hätten wir dann eine reine Tertiana, im zweiten eine Quotidiana, beide erzeugt durch eine Parasitengeneration.

Das Coma kommt ausschließlich bei der Malaria perniciosa vor, weder die Parasiten der Tertiana noch die der Quartana sind imstande, diesen Zustand hervorzurufen; ich kenne auch kein anderes Krankheitssymptom bei den verschiedenen Malariaformen, welches wir als perniciös ansprechen könnten, und betrachte daher die Möglichkeit des Eintretens dieses gefährlichen Ereignisses als identisch mit dem Begriffe der Perniciosität. Dies ist auch der Grund, weshalb ich nach Mannaberg's Vorgange fortfahre, die durch die *Laverania malariae* hervorgerufene Erkrankung als Malaria perniciosa zu bezeichnen,

während sie von den Italienern „Aestivo-Autumnalfieber“ und „Tertiana maligna“, von Koch neuerdings „Malaria tropica“ genannt wird.

Das Coma ist hier ein ziemlich seltenes Vorkommnis und begegnet uns hauptsächlich bei Kranken, in deren Blute der Schizogonie der Parasiten keine Hindernisse erwachsen, wo also die Bildung von Antikörpern ausbleibt und demgemäß die Halbmondbildung gering ist oder fast vollständig fehlt. Die Parasiten vermehren sich unbeschränkt und nehmen schließlich fast alle Blutkörperchen ein. Stirbt solch ein Kranker, so belehren uns Gehirnschnitte über die Ursachen des Comas; wir finden alle Gefäße der Gehirnrinde vollgepfropft mit älteren Schizonten resp. Teilungsformen. Bei der Besprechung der internen Schizonten sahen wir, wie diese Stasen in den Gefäßen zustande kommen und die häufigen Klagen der Perniciosakranken über Knochenschmerzen, Milzschmerzen, Leberschmerzen werden wir nicht mit Unrecht mit Blutstauungen und Stasen in den Kapillaren der Knochen, Milz und Leber in Zusammenhang bringen. Selbst im Gehirn dürften in einem gewöhnlichen Anfalle stets kleinere Bezirke durch infizierte Blutkörperchen verlegt werden, ohne daß weitere Folgen daraus entstehen, als heftige Kopfschmerzen, Schwindel, Erbrechen, leichte Benommenheit; die Gefahr für das Leben liegt nur in der großen Ausbreitung, welche der Gefäßabschluß im Gehirn nehmen kann, wenn weder der Organismus noch ein Heilmittel der Vermehrung der Parasiten ein Ziel setzt.

Die Temperatursteigerung beim Coma ist nicht immer sehr hoch, da die Stoffwechselprodukte ja zum großen Teile in den inneren Organen zurückgehalten werden.

Die Wirkung der Malaria perniciosa auf den allgemeinen Körperzustand der Kranken ist ganz gewaltig; innerhalb kurzer Zeit magern diese in erschreckender Weise ab, sehen verfallen und elend aus und werden rasch sehr anämisch. Die Anämie ist ja leicht erklärlich; in Fällen von langdauernder Erkankung geht eine ungeheure Anzahl von infizierten Blutkörperchen zu Grunde und viele der erhaltenen weisen alle Zeichen schwerer Anämieen auf: Makro-Mikro-Poikilocyten, vereinzelte Erythroblasten; die Blutkörperchen sind hämoglobinarm, verändern leicht ihre Gestalt und nehmen Stechapfelform an, so daß es Mühe macht, gute Präparate anzufertigen. Das nach Romanowsky gefärbte Blutpräparat von chronischen Perniciosakranken kann manchmal ein sehr buntes Bild bieten: neben gewöhnlichen Blutkörperchen, die leicht bläulich gefärbt sind — in jenem Farbentone der Erythrocyten, den ich immer zu erzielen suche — findet sich eine große Anzahl solcher von intensiv roter oder rotvioletter Färbung (Polychromasie); welche Bedeutung dieser Erscheinung zukommt, kann ich mit Bestimmtheit nicht sagen, vielleicht sind es Regenerationsvorgänge[1]. Alle pathologischen Veränderungen des Blutes sind Folgen einer Giftwirkung der Stoffwechselprodukte der Parasiten, sie verschwinden wieder mit der Heilung der Krankheit. Die Anämie bei frischen Infektionen verliert sich unter der Chininbehandlung sogar auffallend rasch; 8 bis 14 Tage machen aus dem Anämischen wieder einen gut und gesund aus-

[1] Die karyochromatophilen Körner A. Plehn's treten bei der Romanowskyschen Färbeweise und bei exakter Vorbehandlung des Präparates selten auf. Nach meiner Ueberzeugung haben wir in ihnen teils wirkliche, teils durch die Präparation hervorgerufene Veränderungen der Blutscheibe zu sehen, welche in keiner Beziehung stehen zu den Malariaparasiten.

sehenden Menschen. In schroffem Gegensatze hierzu steht die Anämie bei Ankylostomiasis, welche wir hier so außerordentlich viel sehen, und welche viele Monate bis ganze Jahre braucht, um zur Heilung zu kommen.

Der Milztumor tritt bei der Malaria perniciosa wenig in den Vordergrund; gewöhnlich ist die Milz schon beim ersten Fieberanfalle geschwollen und fühlbar, hin und wieder ist jedoch eine Vergrößerung des Organes im Beginne der Erkrankung nicht nachweisbar und macht sich auch später nicht bemerkbar. Bei lange dauernden chronischen Fällen wird der Milztumor nicht außergewöhnlich groß und bildet sich mit der Heilung fast vollständig zurück. Jene großen, bis zum Nabel reichenden und ihn selbst überschreitenden Milzen, welche in den Tropen so häufig gefunden werden und die keiner Behandlung weichen, sind meines Erachtens meistens, wenn nicht immer, eine Folge von überstandener Malaria tertiana; wie ich schon bei anderer Gelegenheit erwähnte[1]), ist es ja gut möglich, daß die Stoffwechselprodukte des Tertianaparasiten auf das Milzgewebe, wo sie sich während der Teilung in großer Anzahl aufhalten, einen ähnlichen, zur Hyperplasie führenden Reiz ausüben, wie auf das Stroma der roten Blutscheibe. Die Milztumoren haben forensisch in unseren Breiten eine große Bedeutung, indem ein geringfügiges Trauma Ursache zu ihrer Berstung sein kann, die wohl immer eine tödliche Blutung zur Folge haben dürfte. Die Besitzer von großen, derben Milzen sind weiterhin gefährdet, wenn sie das Unglück haben, an Abdominaltyphus zu erkranken; in dem hiesigen Hospitale sah ich ungefähr 6 Fälle von spontaner Milzruptur infolge von Abdominaltyphus und fand bei den Sektionen, daß die Patienten mit großen, derben Milzen behaftet waren, die sicherlich schon vor dem Typhus bestanden hatten und deren mangelhafte Elastizität den tödlichen Ausgang verschuldete, indem das Organ nicht imstande war, sich den Folgeerscheinungen der Typhusinfektion — Hyperämie, Schwellung — anzupassen.

Ausdrücklich muß ich hervorheben, daß mir während meines 15-jährigen Aufenthaltes in den Tropen (Sumatra und Singapore) kein Fall von Schwarzwasserfieber zu Gesicht kam, trotzdem ich Gelegenheit hatte, die schwersten Fälle von Malaria zu beobachten; demnach möchte ich auch annehmen, daß die beiden Erkrankungen direkt nichts miteinander zu thun haben.

Die Diagnose der Malaria perniciosa ist vermittelst der Romanowsky'schen Färbung sehr leicht zu stellen; das Phänomen der Fleckenbildung erlaubt uns, schon aus den Ringformen mit der größten Sicherheit die *Laverania malariae* zu erkennen und diese Malariaspecies von Quartana und Tertiana abzugrenzen. In meiner langjährigen Praxis ist mir auch noch kein Fall vorgekommen, wo ich bei genauem Suchen die Parasiten in irgend einem Präparate von Malaria vermißt hätte, obschon ich die Möglichkeit zugeben will, daß sich einmal alle Ringe zugleich in die Centralorgane zurückgezogen haben könnten, so daß ein paar Stunden lang im peripheren Blute kein Parasit zu finden wäre. Eine Malaria perniciosa jedoch, bei welcher zu keiner Zeit Parasiten in den peripheren Kreislauf gelangen sollten, halte ich für eine Unmöglichkeit; bei schweren Perniciosaformen, besonders bei der Malaria comatosa, fand ich stets das Blut geradezu überschwemmt mit Parasiten.

---

1) Die Malariaparasiten. (Münch. med. Wochenschr. 1901. No. 9.)

Therapie. Mit ein paar Worten will ich auf die Therapie eingehen, da unser Handeln ja den Lebenseigentümlichkeiten des Parasiten angepaßt werden muß.

Spontane Heilungen der Malaria perniciosa kommen viel seltener und weniger vollständig vor als bei den anderen Arten; eingeleitet werden sie meist durch die Bildung der Gameten und vervollständigt — wie wir uns denken müssen — dadurch, daß nach und nach die aus den Gameten hervorgehenden Schizonten den vom Organismus erzeugten Schutzstoffen erliegen. Eine Thätigkeit der Phagocyten bei diesem Prozesse ist unwahrscheinlich, da wir dafür in den Trockenpräparaten gar keine Anhaltspunkte finden, und unsere Beobachtungen im nativen Präparate, wo wir Halbmonde resp. Sphären sehr oft von Phagocyten „aufgefressen" werden sehen, dürfen wir ebensowenig auf die Vorgänge im cirkulierenden Blute übertragen, als z. B. das Phänomen der Geißelbildung, das auch ausschließlich außerhalb des menschlichen Körpers vorkommt.

Unsere Panacee gegen jede Art Malaria ist Chinin, das wir als ausgesprochenes Protoplasmagift kennen und das als solches auch auf den Malariaparasiten wirkt; bei Patienten, die während der Teilungsvorgänge, also im Beginne des Fieberanfalles, eine Chinineinspritzung erhielten, kann man sehr gut den Zerfall des Protoplasmas in den gefärbten Trockenpräparaten verfolgen; der Kern bleibt dabei sehr lange unverändert erhalten und stellt oft das einzige Ueberbleibsel der Plasmodien in den Blutkörperchen dar, wie ich das besonders bei der Tertiana verfolgt habe.

Die Blutuntersuchung lehrt uns nun folgende Thatsachen, denen unser therapeutisches Vorgehen Rechnung tragen muß:

1) Chinin wirkt am schnellsten und intensivsten auf Merozoiten und auf jene Schizonten, die frei im Blute leben oder an der Oberfläche von Blutkörperchen haften (externe Schizonten).

2) Chinin ist von geringerem Einflusse auf interne Schizonten; es schwächt deren Lebensenergie und verlängert dadurch ihre Entwickelungsdauer; jüngere interne Schizonten sterben auch ab.

3) Noch schwächer ist die Wirkung von Chinin auf die Gameten der Tertiana und Quartana, da diese Formen allein erhalten bleiben, wenn alle Schizonten wie mit einem Schlage getötet sind; aber auch sie verschwinden nach wenigen Tagen vollkommen, wenn Chinin weiter gegeben wird.

4) Ohne sichtbare Wirkung ist Chinin auf die Halbmonde; bei längerer Zufuhr des Mittels nimmt deren Zahl wohl ab, auch verschwinden sie zum Schlusse vollständig aus dem Blute; allein dies ist wahrscheinlich keine alleinige Folge der Wirkung des Chinins auf die Gameten an sich, sondern zum Teil eine solche, auf die aus diesen letzteren entstandene junge Generation.

Aus diesen Beobachtungen, zusammen mit dem, was wir über das Leben der Parasiten wissen, ergiebt sich als notwendige Folge für die Behandlung der Malaria perniciosa der Grundsatz, daß das Medikament im Blute vorhanden sein muß während des externen Lebens der Schizonten.

Verläuft das Fieber als Tertiana, so geben wir entweder eine Chinineinspritzung von 1 g im Beginne des Fiebers und wiederholen diese Dosis in schweren Fällen nach 12 Stunden, oder wir reichen Chinin innerlich während der fieberfreien Zeit und während des ersten Fieberanstieges, 3mal 0,5 in Pausen von 6 Stunden.

Ist das Fieber unregelmäßig, so richten wir uns ganz nach dem Blutbefunde, sind dann allerdings gezwungen, um unseres Erfolges sicher zu sein, nur Einspritzungen zu machen; ist das nicht möglich, so verteilen wir die Chiningaben über den ganzen Tag und geben in 6- oder 12-stündigen Intervallen bis höchstens 2 g, täglich 2—3 Tage lang. Nach dieser Zeit wird das Fieber — wenn nur Malaria vorlag — stets verschwunden sein, und es genügen kleinere Dosen, z. B. 10 bis 20 Tage $^1/_2$ g, um Recidive mit Sicherheit zu verhindern. Waren beim Beginne der Behandlung noch keine Halbmonde vorhanden, bestand auch keine Neigung zu deren Bildung (jüngste Gameten), so treten unter dem Chiningebrauche auch keine auf.

Sind alle Schizonten verschwunden und nur noch Gameten vorhanden, so soll der Kranke anfangs täglich $^1/_2$ g oder jeden 2.—3. Tag 1 g, dann an 2 Tagen der Woche, später in noch größeren Pausen je 1 g Chinin nehmen; am besten ist es natürlich auch, solche Kranke unter Blutkontrolle zu halten und mit Chinineinspritzungen vorzugehen, sobald sich kleine Ringe zeigen.

Färbung der Perniciosaflecken. Seit meiner Veröffentlichung über die Färbung der Wirtszelle des Tertianaparasiten sind mehrere Arbeiten erschienen, die sich mit der Romanowsky'schen Methode beschäftigen; die wertvollste dieser Mitteilungen stammt von R. Reuter[1]), welcher durch die Reindarstellung des spezifischen Farbstoffes das Verfahren so vereinfacht, daß jeder imstande ist, sich der für Malariauntersuchungen geradezu unentbehrlichen Romanowsky-schen Färbung zu bedienen. Ich bin Reuter's Angaben gefolgt und habe sehr gute Bilder erzielt; leider waren aber die Resultate nicht konstant und es ergaben sich bei intensiven Färbungen Mißstände, welche die Methode für meine besonderen Zwecke weniger geeignet machten. Weitere Versuche werden wohl noch lehren, den Reuter'schen Farbstoff allen Anforderungen anzupassen; vorläufig war ich gezwungen, zu meinem alten Verfahren zurückzukehren, wie ich es in den genannten Arbeit ausführlich schilderte. Dort stellte ich 4 Grade von Färbeintensität auf und zeigte, daß wir es vollständig in unserer Hand haben, einen dieser Grade zu erzielen, da die Färbeintensität abhängig ist von der Reife der alkalischen Methylenblaulösung, von der Qualität des Eosins, von dem Verhältnis der Mischung von Eosin und Methylenblau und endlich von der Art unserer Technik. Beim dritten Grade erscheint die Tertianatüpfelung stark, Kerne und Kapsel der Halbmonde leicht gefärbt, beim vierten Grade treten letztere Gebilde sehr kräftig hervor, die Perniciosaflecken dagegen noch nicht; um diese zur Darstellung zu bringen, müssen wir noch intensiver färben. Konsequenterweise nenne ich deshalb den Färbegrad, bei welchem die Perniciosaflecken sichtbar werden, den fünften, womit ich jedoch nicht sagen will, daß bei dem eigenartigen stufenweisen Hervortreten von Gewebedetails außer der Intensität der Färbung nicht auch andere, uns noch unbekannte Faktoren eine Rolle spielen können.

Die Färbung der Perniciosaflecken ist nicht leicht und erfordert sehr sorgfältiges Arbeiten; um nicht zu weitschweifig zu werden, will ich nur

---

1) Reuter, Ueber den färbenden Bestandteil der Romanowsky-Nocht'schen Malariafärbung, seine Reindarstellung und praktische Verwendung. (Centralbl. f. Bakt. etc. Abt. 1. Bd. XXX. 1901. p. 248.)

die wichtigsten Punkte, auf welche es ankommt, näher besprechen und verweise im übrigen auf meine frühere Arbeit.

Haupterfordernisse zur Erreichung des V. Färbegrades sind: gutes Ausstreichen des Präparates, sorgfältige Trocknung und Härtung und eine sehr reife alkalische Methylenblaulösung.

Das nach Jancso und Rosenberger auf absolut reinem Objektträger ausgestrichene Präparat wird zunächst an der Luft getrocknet; bei der hohen Luftfeuchtigkeit des hiesigen Klimas geht das hier und da sehr langsam vor sich, man thut dann gut, entweder den Objektträger leicht vorzuwärmen oder das feuchte Präparat vorsichtig über eine Spiritusflamme zu führen. Ist die Blutschicht gut getrocknet, so wird das Präparat gehärtet; für unsere Zwecke kann ich dazu nur den Aetheralkohol aa empfehlen. Das beste Objekt zur Beurteilung eines Härtemittels für Blutpräparate haben wir in den Leukocyten. In gefärbten Präparaten müssen bei gelungener Härtung die Kerne dieser Elemente scharf konturiert und intensiv wolkig gefärbt sein, es müssen die roten, punktförmigen Granula des Protoplasmas gleichmäßig, dicht gedrängt nebeneinander liegen und trotzdem die einzelnen Körner deutlich abzugrenzen sein, und endlich muß der Saum des Protoplasmas eine regelmäßige Kreislinie bilden. Vergleichende Versuche ergeben nun, daß diesen Anforderungen andere Härtemittel, wie Alcoh. abs., Alcoh. abs. mit Formalin, Alkoholäther mit Formalin, weit besser nachkommen, als der Alkoholäther allein; jene gut härtenden Mittel aber lassen die Perniciosaflecken nur schlecht färben und der Formalinzusatz stört das Zustandekommen der Romanowsky'schen Färbung sehr empfindlich, ja er verhindert dasselbe vollständig schon bei einem Zusatze von 5 Tropfen Formalin zu 150 ccm Härteflüssigkeit. Ein weiterer Nachteil jener Härtemittel, welcher dem Alkoholäther aa fast gar nicht anhaftet, ist der, daß unter ihrer Einwirkung die Eiweißstoffe des Blutplasmas so verändert werden, daß sie sich bei einigermaßen intensiven Färbungen kräftig mitfärben; dadurch erhalten die Blutscheiben rote, körnige Höfe oder das ganze Plasma erscheint leicht gekörnt, wodurch die Uebersichtlichkeit des Präparates stark beeinträchtigt wird.

Unser Präparat verweilt also 10—15 Minuten in dem Alkoholäther aa, wird darauf an der Luft, eventuell sorgfältig an der Flamme, getrocknet und ist nun fertig zur Färbung.

Die gebräuchlichste Farblösung ist das von Nocht angegebene 1-proz. wässerige Methylenblau medic. Höchst mit $^1/_2$-proz. Sodazusatze; besser als Soda bewährten sich mir Zusätze von 1—2 Proz. Ammoniak und besonders $^1/_{10}$ Proz. Kal. caust. fus. zu jener Blaulösung. Die Reifung der Lösung erfolgt bei unserer hohen Durchschnittstemperatur in 4—6 Wochen; je älter die Lösung ist, um so sicherer gelingt die Färbung. Um die Reifung zu beschleunigen, kann man die alkalischen Farblösungen ein oder mehrere Male auf 80° C erwärmen; ich ziehe jedoch die langsam gereiften vor.

Als Eosin hat mir die Marke Eosin rein für Blutfärbung von Grübler & Co. die besten Dienste geleistet; es kommt in einer Lösung von 1 : 1000 in Aq. dest. zur Verwendung.

Technik der Färbung: In einem cylindrischen Becher von 60 ccm Inhalt mischt man 10 Tropfen Methylenblau mit 25 ccm Brunnenwasser[1]), in einem zweiten Becher 15 Tropfen Eosin mit 25 ccm

---

1) Mischt man alte, sehr ausgereifte alkalische Methylenblaulösungen mit reinem

Brunnenwasser; alsdann gießt man die Eosinlösung zu dem Methylenblau, taucht das Blutpräparat in die Mischung und rührt 5 Minuten lang ziemlich lebhaft um, gut darauf achtend, daß die Blutschicht bei dieser Prozedur stets unter dem Niveau der Farblösung bleibt. Nach Ablauf der 5 Minuten bringt man durch Zuschütten von Wasser die Färbeflüssigkeit zum Ueberlaufen, wodurch das obenauf schwimmende, metallisch schimmernde Häutchen abgespült wird; versäumt man diese Vorsichtsmaßregel, so legt sich das Häutchen beim Herausnehmen des Präparates diesem an und verunreinigt es.

Unser Präparat zeigt jetzt eine mehr oder weniger starke Blaufärbung, die man beliebig abschwächen kann durch längeres Einstellen in Aq. dest.; genügt die dadurch erzielte Entfärbung noch nicht, so läßt man das Präparat erst trocknen und bringt es danach nochmals in destilliertes Wasser, wodurch das Blau sehr lebhaft ausgezogen wird. Differenzieren mit Alc. abs. oder dünner Essigsäure halte ich nicht für ratsam.

Bei diesem Färbeverfahren, das in kurzer Zeit ausgezeichnete, reine Bilder giebt, und das ich jetzt fast ausschließlich benutze, tritt nach 2 Minuten Kernfärbung und oft schon die Tertianatüpfelung ein; nach 5 Minuten sind die Perniciosaflecken intensiv gefärbt.

Das Verhältnis von Methylenblau zu Eosin, 10 : 15, war durch Versuche als Optimum gefunden worden; bei jüngeren resp. schwächer färbenden Methylenblaulösungen muß man etwas stärkere Mischungen verwenden, z. B. 15—25 Tropfen Methylenblau zu entsprechend viel Eosin; bei älteren, stark färbenden Lösungen kann man heruntergehen bis 7 Methylenblau zu 10 Eosin; im Interesse der Reinheit des Präparates wird man mit möglichst dünnen Lösungen auszukommen suchen.

Durch einfaches Stehenlassen des Präparates in der Farblösung für eine bestimmte Zeit, wie ich das in meiner früheren Arbeit empfohlen habe zur Erzielung des III. und IV. Färbegrades, gelingt es nur mit ausgezeichnet färbenden Methylenblaulösungen, die Perniciosaflecken zu tingieren.

Auch an dieser Stelle möchte ich meinem Freunde Schüffner herzlich danken für die Herstellung der Mikrophotographieen (Tafel III), welche wertvolle und unentbehrliche Zeugen bilden für die Wahrheit der farbigen Bilder. Die Aufnahmen wurden gemacht mit dem großen Zeiss'schen mikrophotographischen Apparate. Die mangelnde Kraft bei einzelnen Bildern rührt von alten Platten her, die schleierig arbeiteten. Die Haltbarkeit der autochromatischen Platten ist in den Tropen doch eine geringere, wodurch dem Mikrophotographen die Arbeit beträchtlich erschwert wird.

Medan, im Mai 1902.

Aq. dest., so erscheinen die Erythrocyten rot und der erreichte Färbegrad unserer Präparate ist nicht der, welchen wir erzielen, wenn wir Brunnenwasser verwenden oder wenn wir dem Aq. dest. eine Spur Alkali zusetzen (1—2 Tropfen einer 10-proz. Sodalösung auf 50 ccm Wasser); in letzterem Falle sind die Blutscheiben auch leicht bläulich gefärbt, was für den Untersucher von großem Vorteile ist.

Tafel I.

Schizogonie der *Laverania malariae* (Grassi).

Fig. 1—15. Externe Schizonten.

Fig. 1—6. Kleine Ringe. Die Blutkörperchen zeigen keine Veränderung. In den Parasiten der Fig. 1 und 2 fehlt noch die Nährvakuole; in Fig. 2 befinden sich 2 Parasiten mit fadenartig zerstreutem Protoplasma. Fig. 3 zeigt in dem oberen Parasiten deutliche Differenzierung von Kernkörperchen und Kernsaft. Fig. 4 stellt einen freien Parasiten dar (= Taf. III, Fig. 1).

Fig. 7—15. Große Ringe. Alle Blutkörperchen zeigen Flecken, die roten Konturen der größeren Parasiten sind sehr deutlich. Fig. 7 (= Taf. III, Fig. 2): Das Blutkörperchen hat 2 rote Flecken am Ende zweier feiner Protoplasmaarme des Parasiten. Fig. 8 (= Taf. III, Fig. 3) illustriert ebenfalls die Verbindung von Flecken und Protoplasma, welche am deutlichsten zum Ausdruck kommt in Fig. 10 (= Taf. III, Fig. 4). Fig. 11 und 13: Das Protoplasma des Parasiten enthält einige Pigmentkörnchen. Fig. 12: Der Parasit hat 2 Konturlinien, da ein Teil seines Leibes auf der Oberfläche, der andere auf der Unterfläche des Erythrocyten liegt. Fig. 14 und 15 (= Taf. III, Fig. 9): Zwei nebeneinander liegende Blutkörperchen mit Flecken, das eine (Fig. 15) noch bewohnt, das andere (Fig. 14) vom Parasiten verlassen.

Fig. 16—19. Interne Schizonten. Fig. 16 und 18 sind weniger intensiv gefärbt, um das Protoplasma deutlich zu machen; die Blutkörperchen zeigen daher keine Flecken, während diese in Fig. 17 reichlich vorhanden sind. Fig. 16 und 17: Die Konturlinie ist verschwunden, ebenso die Nährvakuole; der Kern ist groß, das Pigment zu einem Klumpen geballt. Fig. 18: Die Kernteilung hat begonnen.

Fig. 19. Teilungsfigur. Der centrale Pigmentklumpen ist umlagert von 14 Merozoiten, die alle einen großen Kern besitzen. Das Blutkörperchen zeigt in den Randpartieen viele Flecken.

Die Bilder 7—13, 17, 19 und 25 sind erzielt mit 5 Monate alter, langsam — ohne Erwärmung — gereifter 1-proz. Methylenblaulösung mit $^1/_2$ Proz. Soda; es wurde stark mit Aq. dest. differenziert, bis die Erythrocyten rot erschienen.

Die übrigen Bilder sind mit 3 Monate alter 1-proz. Methylenblaulösung und 0,1-proz. Kali caustic.-Zusatz gefärbt; die Blutscheiben haben einen leicht blauen Farbenton behalten.

Tafel II.

Sporogonie der *Laverania malariae* (Grassi) Fig. 20—32.

Fig. 20 und 22. Die Parasiten haben strenge Ringform; Protoplasma und Kern bilden ein gleichmäßig breites Band um die Nährvakuole; Flecken auf dem Blutkörperchen fehlen, ebenso die Konturlinie zwischen Parasit und Blutscheibe. In Fig. 21 sind 3 feine Pigmentkörnchen. In Fig. 22 beginnt die Färbung der Hülle oder Kapsel.

Fig. 23. Hülle sehr deutlich, die Vakuole verschwunden, Kern aufgelockert, reichlich grobkörniges Pigment.

Fig. 24 und 25. Weitere Stadien auf dem Wege zur Halbmondform; Kapsel wird immer deutlicher. Auch in Fig. 23—25 hat das Blutkörperchen keine Flecken; in Fig. 25 beginnt die Schrumpfung der Blutscheibe.

Fig. 26. Ausgebildeter Gamet (Makrogamet): Blutkörperchenrest dem Parasiten glatt anliegend; Kern groß, locker, von Pigment umlagert; über den Parasitenleib hin erstreckt sich ein regelmäßiges Maschenwerk: das der Kapsel angehörige Fadennetz.

Fig. 27. Weiblicher Gamet (Mikrogamet): großer Protoplasmaleib, in seiner Mitte 2 kleinere Kerne von Pigment umgeben.

Fig. 28. Männlicher Gamet (Mikrogametocyt): schmaler Protoplasmasaum um einen großen, sehr lockeren Kern; Pigment über den Kern zerstreut.

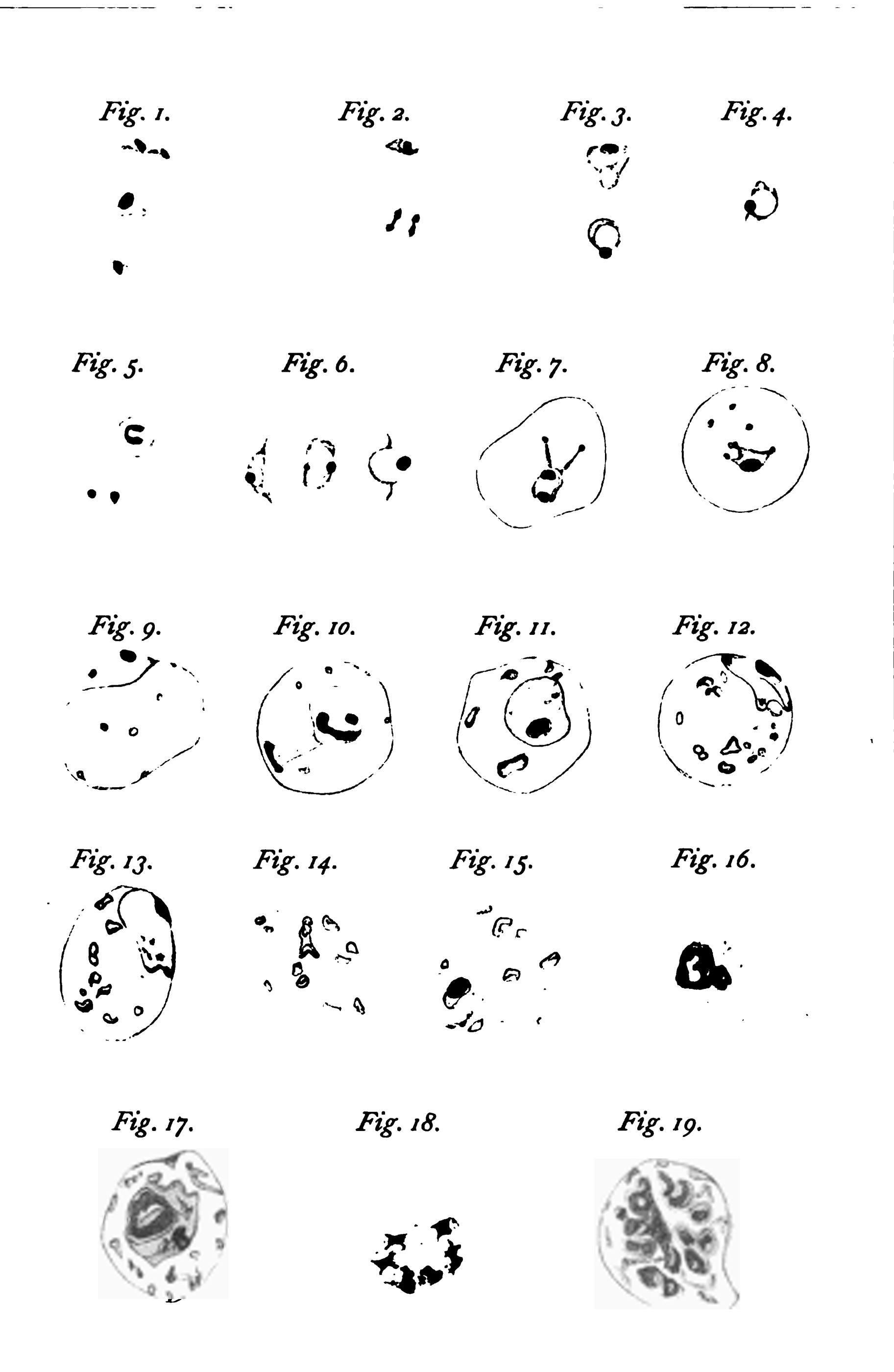
Fig. 29. Weiblicher Gamet mit Blutkörperchenrest, der teilweise von einer roten Blutscheibe bedeckt wird; das Maschenwerk der über den Parasiten ziehenden Kapsel zeigt dicke Knotenpunkte.

Fig. 30. Aelterer männlicher Gamet, der den Blutkörperchenrest verloren hat und nur noch von der Kapsel umschlossen ist.

Fig. 31. Männlicher (?) Gamet mit centralem Pigmentklumpen, neben diesem der himbeerförmige Kern in beginnender Teilung.

Fig. 32. Teilungsfigur eines Gameten (?): ein centraler Pigmentklumpen von 30 Merozoiten umlagert (nach Mannaberg-Schüffner gefärbt, im Jahre 1899 gezeichnet).

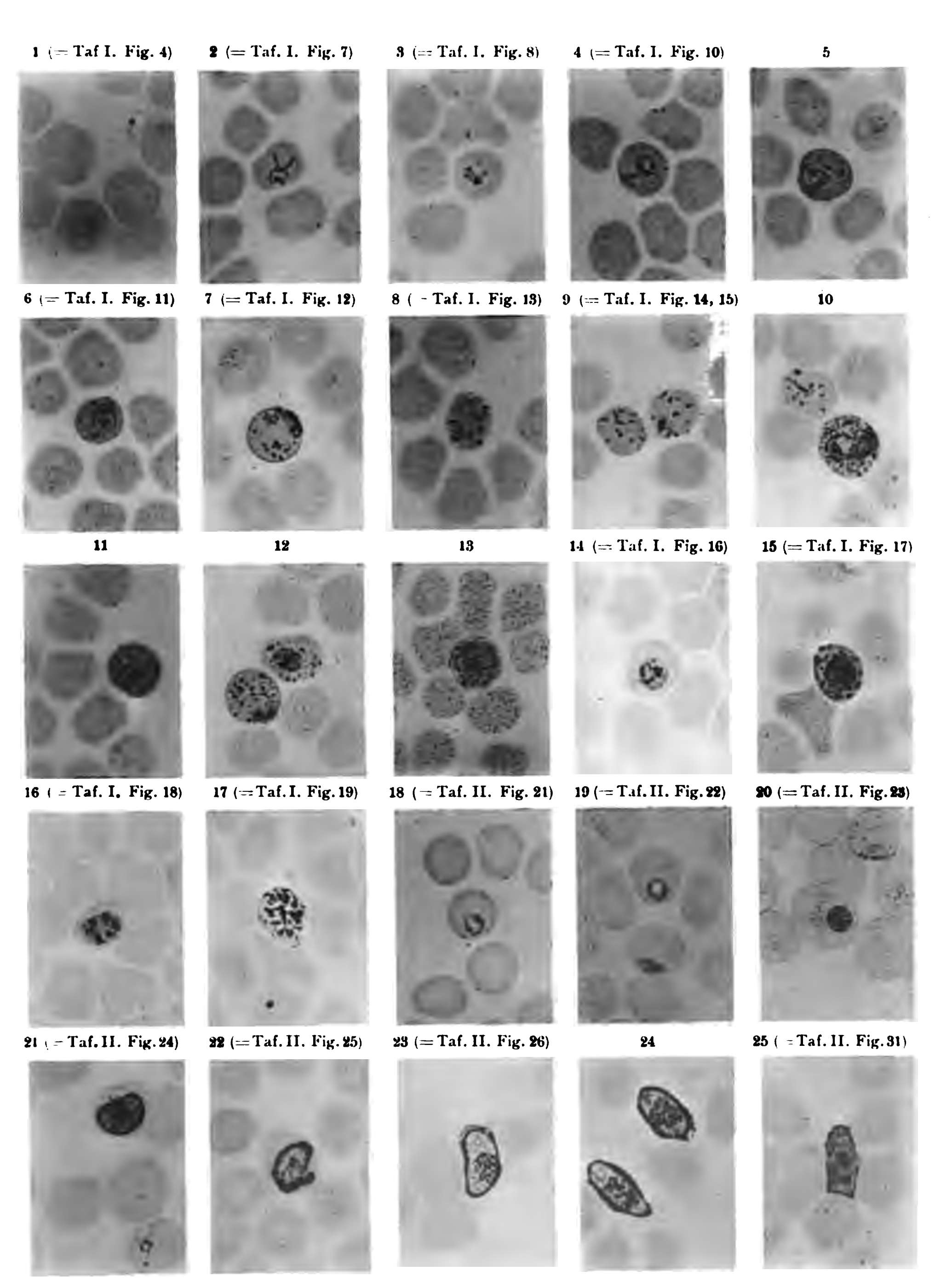
Bild 32 ist gefärbt nach Mannaberg-Schüffner, Bild 25 mit Sodamethylenblau, alle übrigen Bilder mit Kalilauge-Methylenblau.



Taf. I Schizogonie der Laverania Malariae (Grassi)

Dr. G. Maurer del. Verlag von Gustav Fischer, Jena. P. Weise, Lith., Jena.



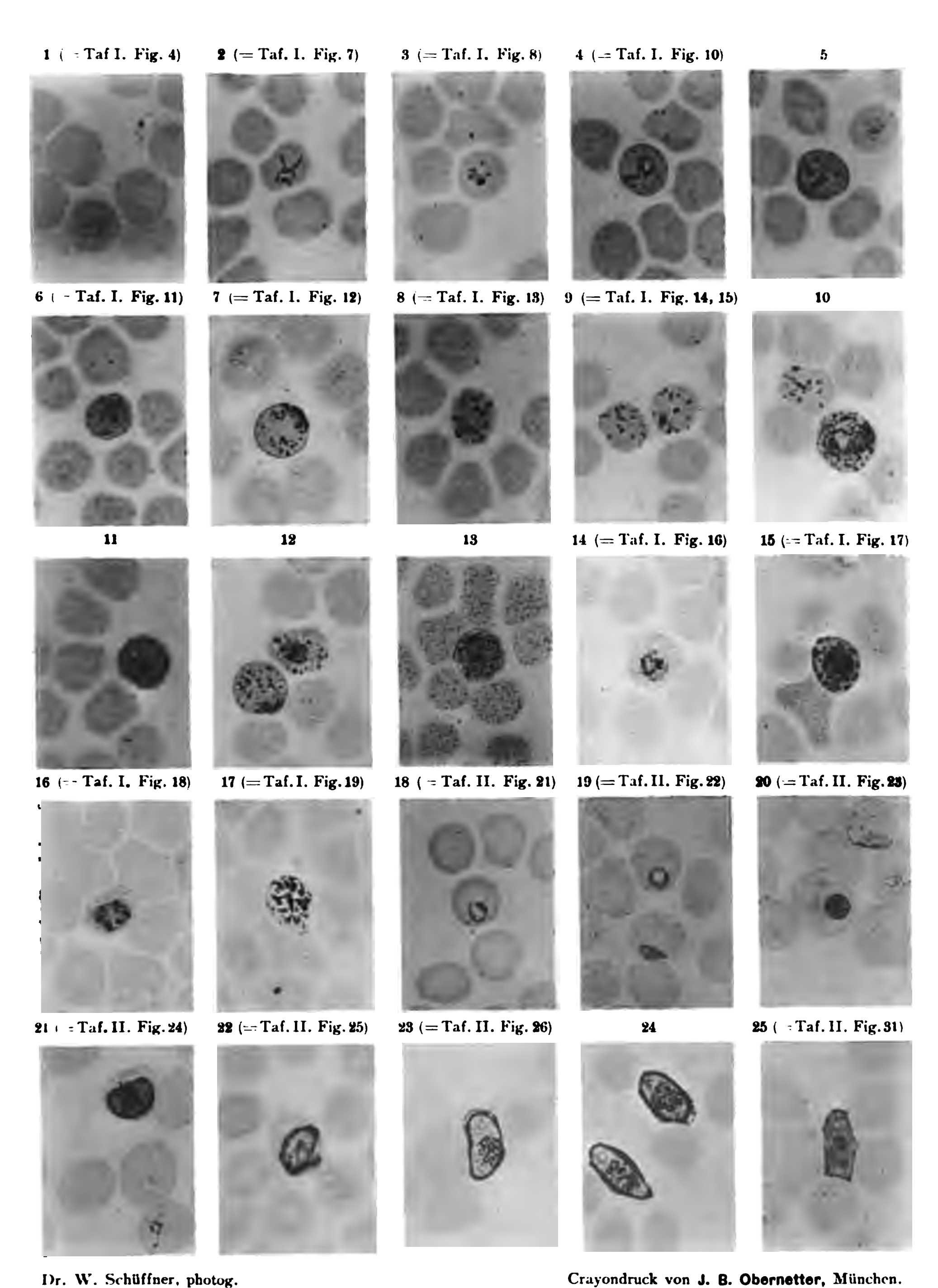


Dr. W. Schüffner, photog. Crayondruck von **J. B. Obernetter**, München.

Tafel III.

Verlag von **Gustav Fischer** in **Jena**.





Tafel III.

Verlag von **Gustav Fischer** in **Jena.**

Tafel III.

Fig. 1. Freier Parasit oben, unten kleine Ringform.

Fig. 2—9. Große Ringe; Flecken der Wirtszelle, besonders scharfes Hervortreten der Konturlinie zwischen Parasit und Blutscheibe.

Fig. 10. Großer Ring mit Flecken der Wirtszelle neben einem Tertianaparasiten mit Tüpfelung der stark geschwollenen Blutscheibe.

Fig. 7, 11, 12, 13. Große Ringe mit Flecken der Blutkörperchen; neben den Flecken ist auch die Stromazeichnung sichtbar, sowohl in den infizierten als auch in den normalen Blutkörperchen.

Fig. 14—16. Interne Schizonten.

Fig. 17. Teilungsfigur.

Fig. 18—22. Junge Gameten (in Fig. 21 unten rechts eine kleine Ringform).

Fig. 23. Ausgewachsener Halbmond (Makrogamet).

Fig. 24. Ein männlicher (oben) und ein weiblicher Gamet (unten).

Fig. 25. Konzentration des Pigmentes und beginnende Kernteilung. (Bei Herstellung der Photographie waren die Farben des Präparates leider etwas abgeblaßt.)

Vergrößerung: Zeiss Apochromat und Projektionsokular $\frac{2 \times 1000}{2}$.

Cephalogonimus americanus (new species).

By **J. Stafford,** M. A., Ph. D.
Mc Gill University, Montreal, Canada.

With 1 plate.

The genus *Cephalogonimus* (κεφαλη, γονιμος) was instituted by Poirier[1]) in 1886. It is frequently but reservedly referred to by Pagenstecher and Braun[2]), is considered well founded by Stiles and Hassall[3]) who state that it is adopted by Stossich, Railliet and Monticelli, and it is doubtfully recognized by Looss[4]).

With the type species, *C. Lenoiri* Poir., from the intestine of a Senegal turth (*Tetrathyra Vaillantii*), have been associated more or less closely the species *Dist. ovatum* Rud. and *Dist. pellucidum* Linst., from various birds.

The species here described must undoubtedly be added to the new genus, is most closely allied to the type, and is of particular interest as occurring in an amphibian.

The first individual to come under my notice I obtained from the duodenum of a green frog (*Rana virescens*) at Ashbridge's Bay, Toronto, in May 1900. It is a large adult worm (Fig. 1) and so distended with eggs as to make it difficult to determine even the main characters. A few weeks later and about 100 mls. north-west of Toronto I came upon several young examples of the same species — this time, as far as my recollection serves, in *Rana clamata*. I did not again see this worm until Dec. 1901, when I obtained, in Montreal, over forty of varying ages and sizes, and again in Mar. 1902 several more were procured —

---

1) Poirier, Trématodes nouveaux ou peu connus. (Bullet. de la Soc. Philom. de Paris. Sér. VII. T. X. 1886. p. 3—5. Pl. II. Fig. 1—3.)

2) Pagenstecher and Braun, Bronn's Klassen und Ordnungen des Tierreichs. Leipzig 1879—1893. p. 642, 645, 696, 704, 705, 713, 885, 886, 890, 893, 911.

3) Stiles and Hassall, An inventory etc. (Archives de Parasitologie. I. No. 1. 1898. p. 85—86.)

4) Looss, Weitere Beiträge etc. (Zool. Jahrb. Bd. XII. 1899. p. 625—627.)

both lots from *R. virescens*. These last occasions were at the laboratory and I was accordingly in position to examine the living worms and able to satisfy myself that they were distinct from *Dist. quietum* [1]), a species occupying the same position in the intestine of several kinds of frogs and resembling this one closely in size, shape, colour, suckers, and other superficial characters.

The size of my largest mounted specimen (Fig. 1) is 2,89 mm in length by 0,83 mm in greatest breadth, but a medium-sized adult worm may surpass these measurements while living. The one represented in Fig. 2 measured 3,25 mm × 0,87 mm. My youngest mounted specimen that contains any eggs is a little less than 1 mm in length and 0,3 mm in breadth.

The shape may vary somewhat within certain limits but is frequently cylindrical, narrowing a little towards the ends, and then rounded. Sometimes the central portion of the body is uniformly thick for a considerable distance, sometimes the point of greatest thickness is at the middle, frequently it is moved backwards or forwards a little to a point about a third from one or other end. In many cases the posterior end is blunt or slightly indented at the excretory pore. In transverse sections the body shows nearly circular but may be slightly flattened from above downwards (Fig. 4).

In colour this species is whitish or grayish, sometimes with a distinct yellow tinge, and in old worms, containing eggs, parts of the posterior half may present a lighter or darker brown colour.

The suckers, in the preserved individuals whose dimensions I have given above, measured, in the directions of the length and the breadth of the animal, 0,26 × 0,24 mm for the anterior and 0,21 × 0,23 mm for the posterior, and the centre of the latter was 0,82 mm from the anterior end of the worm. In the living worm mentioned the corresponding figures were 0,33 × 0,30, 0,20 × 0,23, and 1,04 mm respectively. In the first case the animal is $3^1/_2$ times as long as the distance between the anterior end and the centre of the ventral sucker, in the second case only 3 times, and I have mounted specimens in which it is only $2^1/_2$. Generally the posterior portion of the body lengthens with the increased production of eggs. The depth of the suckers can be clearly judged from the median sagittal section (Fig. 3). In living worms the anterior end of the animal is often projected slightly forwards above the oral sucker.

The cuticle, about 0,011 mm deep, is provided with thickly disposed, pointed, backwardly projecting spines about 0,014 mm long. arranged in diagonal rows about 0,011 mm apart anteriorly, becoming less numerous as one proceeds backwards and finally ceasing near the posterior end of the animal. Subcuticular cells, parenchyma, muscle-fibres, and skin-glands are apparently the same as in other genera of Trematodes.

Of the intestinal system the mouth or cavity of the anterior sucker looks downwards and forwards. The deepest part of its wall is perforated and continued as a short pre-pharynx; the pharynx is a muscular bulb about 0,1 mm in length; the oesophagus, about 0,125 mm in length, bifurcates at its posterior end, giving rise to two intestinal caeca. These diverge lateralwards and then bend backwards, running parallel

1) Stafford, Zool. Jahrb. Bd. XIII. 1900. p. 403—406. Taf. 26. Fig. 4.

with the sides of the animal towards its posterior end, of which however they fall far short, constituting what might be called half-length caeca. In the 2,78 mm worm already referred to the point of bifurcation is 0,5 mm from the anterior end, the caeca are about 1,5 mm long, and from their blind ends to the posterior end of the animal measures 0,8 mm. The caeca vary in thickness in different individuals being in some empty, narrow and obscured, while in others they are conspicuous, broad and filled with fluid containing epithelium cells, blood corpuscles, eggs etc. that have been swallowed, but they are not distinctly or differently coloured from the surrounding organs.

I have not attempted to follow the nervous system or the excretory vessels but the posterior part of the latter is often very evident, extending from the excretory pore at the end of the body forwards between the intestinal caeca as for as to the posterior testis where it branches left and right; its broadest part behind the caeca gives rise on each side to four on five lateral branches that divide and subdivide.

There remains to be described the reproductive system, which is a very complex system, consisting of A. what may be conveniently although somewhat inaccurately named genital glands and B. the ducts or canals that convey C. their products. Belonging to A. are: 1. the essential genital glands comprising (1) a single ovary and (2) two testes — three generally conspicuous more or less spherical organs lying in a zig-zag line behind the level of the ventral sucker, between the crura of the intestine, and (3) a double vitellarium [1]) lying along the outer sides of the caeca; 2. the accessory genital glands consisting of (1) the shell-gland on the opposite side of the body from the ovary and (2) the prostate gland [2]) towards the anterior distal end of the male genital duct. Belonging to B. are 1. the oviduct, 2. the sperm ducts, and 3. the vitelline ducts, each of which class is composed of specially modified regions to be afterwards mentioned.

C. The products of the essential genital glands viz. 1. ova-cells, 2. sperm-cells, and 3. vitellin-cells are specially differentiated cells. Not so however with the accessory genital glands, which are true glands,

---

1) The matter secreted by these glands is destined to serve as food for the developing embryos and one may regard it, I suppose, as being homologous either with the vitellus which loads a frog's egg or with the albumen which surrounds the yolk of a hen's egg. In the first case it would really be part of the ovum and the vitellarium part of or at any rate equivalent to the ovary, while in the second case there is no such equivalence and the vitellarium must be looked upon as a differentiated part of the oviduct. In the first case the vitellarium would be an essential genital gland, in the second an accessory genital gland. That the vitellin-cells of the trematode egg are more on an equality with the yellow yolk of a hen's egg i. e. are really part of the ovum is shown by their early absorption, even in the process of segmentation. Their cellular character speaks for their being on a par with the trematode ovarian ovum, which could not of itself proceed very far in the process of embryoformation for lack of funds. That the vitellarium is, so to speak, the other half of the trematode ovary is perhaps not lacking in support from the side of morphology. In many trematodes this organ reaches an enormous development, along the whole length of both sides of the animal (e.g. *Sphaerostomum globiporum* Rud. or species of the genus *Haematoloechus*); in others it reaches only a moderate development, along the sides of the middle portion of the body (e.g. *Dist. fellis* Olss. or the one here described); while in still others it is but a small organ, situated near the axis of the body, between the caeca, and close by the ovary as if just separated from it (e. g. *Derogenes varicum* or species of the genus *Gorgodera*).

2) In some trematodes there is an homologous cement gland near the end of the female genital duct.

in which the product is a secreted fluid formed in the bulbular part of the flaskshaped cells and conveyed through the lengthened, neck-like conducting part; the whole gland mass is composed of numbers of such unicellular glands.

The ovary is situated behind and to one side from the ventral sucker, so close behind as to be partly overlapped by the margin of the sucker. In 17 out of 28 mounted specimens it is on the left, in the other 11 on the right. It is globular or slightly oval in shape. From its inner side springs the oviduct which near its origin opens in succession into the seminal receptacle, the Laurer's canal, and the yolk-reservoir. The first or receptaculum seminis is flask-shaped, close to and above the ovary, and filled with sperm. The canal of Laurer is a narrow duct running irregularly backwards and upwards to open in the mid-dorsal line above the inner boundary of the first testis. The third or receptaculum vitelli is not a constantly conspicuous organ but only exists as such when distended with yolk. It has three openings: the one into the oviduct and left and right angles opening into the transverse vitelline ducts. Immediately after passing the mouth of the yolk-reservoir the oviduct expands into a thicker-walled part, the ootype, and is surrounded by the shell-gland. These two organs often form a somewhat dense mass lying on the opposite side from the ovary. The next short division of the oviduct is often filled with sperm — receptaculum seminis uterinum — and is succeeded by a very long part which in mature animals contains eggs — the uterus. After leaving the shell-gland it turns backwards forming series of mostly transverse folds down one side of the animal to its posterior end and then in a similar manner forwards along the other side. The terminal part, becoming straighter, passes the ventral sucker and, running parallel with the penis, opens with the latter into a short genital sinus that perforates the skin in the mid-dorsal line, above the mouth sucker.

The last short division of the uterus, lying beside the penis, and opening into the sinus genitalis, is often called the vagina, but in this worm it is not enlarged or muscular and is apparently devoid of glands and only to be followed when containing eggs.

The first or anterior testis is situated close behind the shell-gland i. e. on the opposite side from the ovary, its outer wall lying against the intestine of that side and its inner wall in the middle long itudinal axis of the worm. The second or posterior testis is close behind the first; it lies in the centre of the transverse diameter of the worm and in the first worm that I examined (Fig. 1) it was exactly in the centre of the longitudinal axis, but it is more often just behind the centre of the animal. Both are spherical organs rather larger than the ovary. Anteriorly each gives origin to a narrow vas deferens that runs forwards and, near the antero-lateral border of the ventral sucker, joins a much larger and always conspicuous object, the cirrus sac. This is long and flask-shaped, with the larger end turned backwards, lying dorsal to the ventral sucker and the plane of the intestinal caeca, and sometimes reaching to the ovary. This bulb-like posterior part dips downwards between the caeca at the sides, the sucker behind, and the bifurcation of the intestine in front, and, crossing diagonally under that caecum which is on the opposite side from the ovary, it narrows into a long neck which turns dorsalwards, inwards and forwards. In living, extended animals this becomes straightened almost parallel with the oesophagus

and pharynx but in contracted worms it may be thrown into a number of wavy bends. Through the centre of this body runs a tube, the continuation of the conjoined vasa deferentia. In the posterior part it is broad, occupying the greater part of the breadth of the surrounding penis-sac, and filled with sperm — vesicula seminalis or seminal vesicle — while anterior to this is a smaller, bulbular part, constricted from it, which narrows gradually into a long duct — the ductus ejaculatorius. Surrounding the ductus but inside the cirrus sac is a small number of unicellular prostate-glands each of which opens by a little neck into the ductus ejaculatorius. The most anterior part of the ductus can be protruded from the genital pore, constituting a penis or copulatory organ. When retracted the penis does not open through the skin of the worm but into a short pouch which also receives the opening of the uterus. This is the genital sinus (sinus genitalis) and it opens by the genital pore (porus genitalis) onto the outer surface of the animal, in the mid-dorsal line, a little way back from its anterior end, and above the mouth cavity.

The vitellaria form a pair of organs situated right and left along the outer sides of and above the intestinal caeca for the greater part of their length but not reaching to their origin anteriorly nor to their blind ends posteriorly. Each consists of a number of flask-shaped follicles with narrowed ends opening into a longitudinal vitelline duct that passes between them. From near the middle of each of these ducts there rises a transverse vitelline duct which passes inwards between the ventral sucker and the first testis to meet its fellow of the opposite side and form the vitelline reservoir already mentioned.

During the first coition sperm must be introduced into the distal end of the uterus (vagina) whence it travels through the long empty uterus and becomes stored up in the receptaculum seminis. Ova cells become loosened from the inside of the ovary and travel out singly into the proximal part of the oviduct (fertilization space) where they meet with sperm from the receptaculum seminis that unite with them. The fertilized ovarian cell then passes into the ootype which also allows a number of yolk-cells, constituting a definite bulk, to enter from the yolk reservoir. These it moulds into a characteristic shape while the shell gland pours round the mass its secretion which hardens to form the shell. One egg after another is formed in this way and passed into the uterus. During this time it is difficult for newly arrived spermatozoa to pass through the ootype and they are mostly aggregated in the proximal part of the uterus (receptaculum seminis uterinum). For such a small animal there is a relatively enormous amount of reproductive matter formed in the ovary, the testes, and the vitellaria, all converging in its movements towards the fertilization space. It is hardly conceivable that the supply from the different sources is accurately proportioned, or if it were that it could be invariably accurately combined. It may result that there is too much yolk or that old and enfeebled or dead sperm may become detrimental. From such useless or even dangerous material and especially also from the pressure of over-production the animal may relieve itself by means of the Laurer's canal.

It is probable that ordinarily cross-fertilization between two individuals takes place, but possibly in cases of isolated individuals self-fertilization may occur. The eggs pass slowly through the uterus, giving time for the development of the embryo, which by the time the eggs

are deposited are ready to burst one end of the shell and issue as free-swimming miracidia. One of the normal, ripe, embryo-containing eggs measures 0,052 × 0,026 mm when fresh and scarcely less when preserved. It is elliptical in shape and has a light yellowish-brown shell.

Judging from the brief account by Poirier, *Cephalogonimus Lenoiri* differs but little from the one I describe. Yet it hardly seems probable that the same species should occur in a West-African turtle and in a North-American frog.

Small differences of measurement are not sufficient distinction, for the same organ will often appear larger or smaller according to the pressure applied or the state of contraction of the animal. Relative sizes are likely to give better results. Poirier states that the anterior sucker of his worm is smaller than the ventral, giving their diameters as 0,24 and 0,29 mm respectively. In *Cephalogonimus americanus* the mouth sucker is larger than the ventral. The living worm whose measurements I have given was slightly longer but slightly narrower than the size given by Poirier. It would probably have measured nearly the same under similar conditions of pressure, contraction &c. The average between the length and the breadth of its suckers gives 0,31 mm for the anterior and 0,21 mm for the ventral. According to Poirier the genital opening is at the end of a papilla which juts forwards anterior to the mouth sucker. In my worms the genital opening is above the mouth and plainly some distance from the anterior end. The egg of *Ceph. Lenoiri* is given as 0,035 × 0,017 mm. In *Ceph. americanus* it is 0,052 × 0,026 mm.

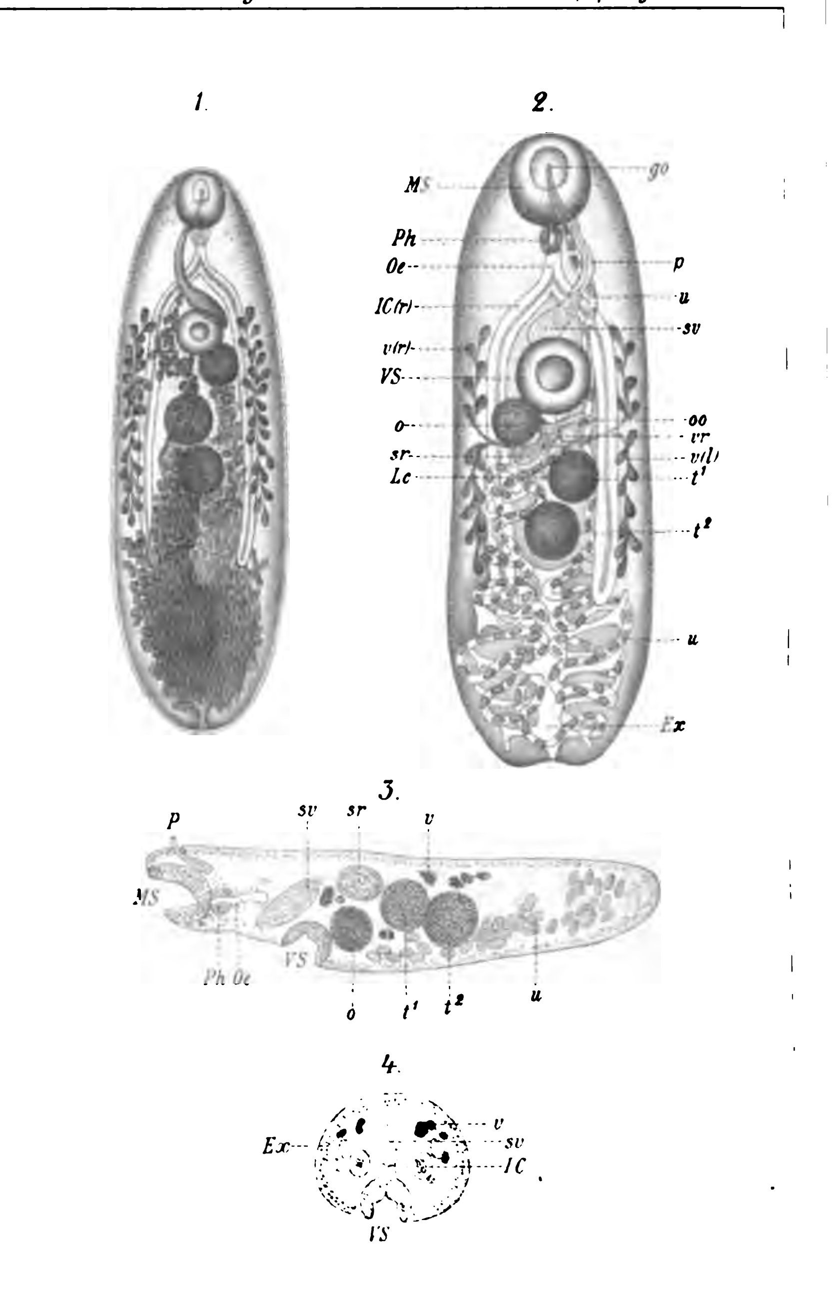
Note. Three worms have been mentioned by Leidy that may be noticed here, viz.
1) *Distomum retusum* Duj. (Proc. Acad. Sci. Vol. V. 1850—1851. Philad. 1852. p. 207; ibid. Vol. VIII. 1856—1857. p. 44.
2) *Monostomum ornatum*; ibid. Vol. VIII. p. 43.
3) *Holostomum nitidum*; ibid. Vol. VIII. p. 44.

With regard to the first Leidy's description is briefly this: '*Dist. retusum* Duj., small intest. *Rana halecina*. Len. $^3/_4$—$1^1/_2$ lines, Br. $^1/_4$ line. Whitish, yellowish-brown ova. Oblong, sublinear, narrow anteriorly, truncate posteriorly, slightly sinuous. Oral acetabulum larger than ventral. Posterior respiratory sinus very large'.

There is nothing in his description that points unmistakably to *Ceph. americanus*. The habitat is the same (*R. halecina* = *R. virescens*). The size equals that of a rather small, outstretched Cephalogonimus. The colour is near the mark. The shape and suckers correspond, while the expressions 'truncated posteriorly' and 'slightly sinuous' seem particularly applicable to many individuals and the reference to the respiratory sinus would appear to be unquestionable. It must be observed however that the features here mentioned are most superficial and vary within wide limits. Consequently while it is important that they should be mentioned and while for a time they may serve to distinguish one species yet they are by no means conclusive and more especially when several species come to be known of nearly the same habitat and external appearance. Thus there is not a single character in the above account by which I can separate the worm described from *Distomum quietum*.

Leidy referred his specimens to Dujardin's *Distomum retusum* (Duj. — (Hist. nat. des Helm. Paris 1845. p. 405—406) which has its "Orifices genitaux contigus à la ventouse ventral en avant". If this one thing is true of Leidy's species it is certainly not the worm I describe. But since he makes no mention of this point we are at liberty to doubt whether he paid sufficient attention to his worms to observe it. Even Dujardin's *Dist. retusum* is pronounced by Looss (Die Distomen unserer Fische und Frösche p. 82): „Eine sehr problematische Art .... Zusammenfassung von zwei .... Wurmarten" viz. *Dist. endolobum* Duj. and *Dist. medians* Olss., the first of which appears to be represented here by my *Dist. quietum* and the second is perhaps represented by a worm reported by me (Zool. Jahrb. 30. Aug. 1900. p. 412—414) provisionally as *Dist. medians* Olss. and about the some time by Nickerson (Amer. Naturalist. Vol. XXXIV. Oct. 1900. p. 811—815) under the name of *Dist. arcanum*





Stafford gez. Verl. v Gustav Fischer, Jena. Lith. Anst. v. J. Arndt ...

n. sp. Further discussion can not profitably be entered upon here but with the information at present at my disposal I am inclined to regard Leidy's *Dist. retusum* as identical with *Cephal. amer.*

Concerning the second worm, *Monos. ornatum* Leidy, I may say that of the hundreds of frogs I have examined I have never yet found a Trematode free in the body-cavity and I doubt if anybody else has ever obtained one that did not first get there by the accidental cutting or tearing of some other organ. Leidy's description is in brief: '*Monost. ornatum*, abdominal cavity *Rana pipiens*. Len. $1-1^1/_2$ lines. Br. $^1/_2-^3/_4$ line. Thick. $^1/_4-^1/_2$ line. Compressed, ovoidal, ant. broad. Yellow, varieg. with brownish red. Mouth infero-term., transv. oval. Penis conical, protrud. short dist. below mouth. Fem. apert. short dist. below penis'. So far as I can yet judge this worm must have been liberated either from the lung (*Haematoloechus* sp.) or from the small intestine (*Dist. quietum* or *Cephalogonimus amer.*). I am inclined towards the first view chiefly from two reasons: the name *Monostonum* on account of the ease with which the small ventral sucker may be overlooked, and the readiness with which worms may be freed from the lungs without observation. In this case it must have been young specimens since the length is given as 1 to $1^1/_2$ lines. The shape, colour, genital openings &c. may be correlated with this view. In the forthcoming number of the Zoolog. Jahrb. Bd. 16 I have shown that there are five species of this genus occurring in this country, representatives of *Haematoloechus* (*Dist.*) *variegatus* Rud. of Europe, and it may well have happened that the young of one of these escaped Leidy's recogniton. It could scarcely have been *Dist. retusum* (*Ceph. amer.*?) since he reports it also in the same paper although he does not describe it there but in an earlier number. It is unlikely to be *Dist. quietum* from the position of the genital openings, as well as other reasons that will appear in the following considerations.

The third worm mentioned by Leidy was described as follows: '*Holostomum nitidum*, small intest. *Rana pipiens*. Len. $1^1/_8$ l. Br. $^2/_5$ l. Body compressed, oblong-oval, constricted at ant. third, echinated. Variegated, white with yellow. Head ovoidal, mouth term., round cup-shaped pharynx'.

The only other worm beside *Ceph. amer.* known to me as occurring in the small intestine of our frogs is *Dist. quietum*. It may be correlated in size, shape, spines, colour, and habitat with the description given above but the mouth is not normally terminal nor the body constricted. Leidy's description is given in the same paper in which *Dist. retusum* (= *Ceph. amer.*?) is reported (though not described) so it can hardly be identical with the latter. If it is *Dist. quietum* it is difficult to understand why he called it *Holostomum*.

Description of figures.

Fig. 1. *Cephalogonimus americanus* n. s. Len. 2,89 mm, Br. 0,83 mm. From duodenum, *Rana virescens*. Fixed, stained, mounted in balsam. Viewed in microscope, from ventral surface.

Fig. 2. *Cephalogonimus americanus*. Len. 3,25 mm, Br. 0,87 mm. Living animal, from ventral surface. *MS* mouth sucker; *Ph* pharynx; *Oe* oesophagus; *IC(r)* intestinal caecum of right side; *v(r)* vitellarium, right side; *VS* ventral sucker; *o* ovary; *sr* seminal receptacle; *Lc* Laurer's canal; *go* genital opening; *p* penis; *u* uterus; *sv* seminal vesicle; *oo* ootype; *vr* vitelline reservoir; *v(l)* vitellarium left side; t^1 anterior testis; t^2 posterior testis; *E* excretory vessel.

Fig. 3. *Cephalogonimus americanus*. Sagittal section, selected from a series. Letters same as for Fig. 2.

Fig. 4. *Cephalogonimus americanus*. Transverse section through the region of the ventral sucker. Letters as above.

Ueber die Untersuchung des Pockenerregers.

Von Dr. **Keïsuke Tanaka**, Akita-Ken, Japan.

Seit 1891 habe ich in der nordöstlich von Japan gelegenen Stadt Yusawa mehrere Tausend von Kindern vacciniert und bei dieser Gelegenheit über den Inhalt der Vaccinebläschen öfters genaue mikroskopische Beobachtungen angestellt. Hierbei konstatierte ich, daß im Bläscheninhalt am 5. bis 7. Tage nach der Impfung gewöhnlich außer wenigen weißen Blutkörperchen nichts zu finden war, was als Pockenerreger betrachtet werden könnte. Es könnte dies die Erforschung des Pockenerregers leicht irre leiten, weil in der Regel der Pustelinhalt in den späteren Stadien, also etwa nach dem 7. Impftage, außer der Vermehrung der weißen Blutkörperchen noch die Beimengung mit verschiedenen anderen geformten Elementen, wie roten Blutkörperchen, intensiv färbbaren, in immer kleinere Bröckelchen und Körnchen zerfallend, weißen Blutkörperchen und pflanzlichen Mikroorganismen auftritt. Dergleichen kann auch in den früheren Stadien, also vor dem 7. Impftage, vorkommen, wenn das Bläschen durch Kratzen oder Kleiderreiben u. dergl. berstet und der Inhalt desselben direkt mit der atmosphärischen Luft in Berührung kommt, oder wenn die in Gebrauch genommene Vaccinelymphe von vornherein die Entzündungserreger in sich trägt.

Ebenso würde die animale Lymphe wegen des Vorhandenseins verschiedener sonderbarer Degenerationsprodukte für die diesbezügliche Erforschung unzweckmäßig sein.

Aus dem Gesagten erklärt es sich, daß der Bläscheninhalt am 5. bis 7. Tage nach der Impfung für die Erforschung des Pockenerregers am zweckentsprechendsten ist, falls die Vaccination mit keimfreier Lymphe ausgeführt und die Bläschen gegen jede Exkoriation geschützt werden können.

Nur auf diese Weise hatte ich die Lymphe bei einer großen Anzahl von geimpften Kindern zu meiner mikroskopischen Untersuchung ausgewählt. Doch war ich nicht imstande, auf den Deckglaspräparaten, bei welchen die wirksamste Lymphe am 7. Impftage reichlich verklebt ist, außer nur wenigen weißen Blutkörperchen den Pockenerreger in irgend einer Form aufzufinden.

Immermann[1]) schreibt diesbezüglich, wie folgt: „Bedeutsam erschien jedoch, wenngleich nur in negativer Hinsicht, daß gerade der noch klare (nicht bereits eiterig gewordene) Inhalt der Variolaefflorescenzen im vesikulösen Stadium (und ebenso auch die klare Vaccinelymphe), trotz evidentester infektiöser Eigenschaft, dennoch sich recht oft anscheinend völlig frei von parasitären Formationen erwies."

Ich betone nochmals, daß ich bei meiner mehrjährigen Untersuchung in der wirksamsten Lymphe am 7. Impftage nichts Auffälliges fand, und ich muß deswegen meine Stimme gegen jede Ansicht erheben, die die tierischen oder pflanzlichen Mikroorganismen als Pockenerreger annimmt.

Was die Guarnieri'schen Körperchen[2]) in den Epidermoidal-

1) Immermann, H., Variola. 1896. p. 24.
2) Pfeiffer, L., Die Protozoen als Krankheitserreger. Nachträge. 1895. —

zellen der Vaccine- und Variolapusteln anbelangt, so ist Hückel[1]) durch seine gründlichen und sorgfältigen Untersuchungen zu dem Ergebnisse gelangt, „daß bei Vaccine an der Impfstelle in der Cornea zunächst gewisse Teile des Zellleibes der Epithelien, die der Markschicht des Protoplasmas angehören, in ganz eigenartiger Weise erkranken. Die hierbei entstehenden eigentümlichen Bildungen, deren mannigfache Gestalten durch wechselnde und noch unbekannte Strukturverhältnisse des Cytoplasmas bedingt sein müssen, erscheinen danach als direkte Abkömmlinge des letzteren und nicht als die ursächlichen parasitären Protozoën der Vaccine, für welche sie ausgegeben worden sind."

Die bisher in den Vaccine- und Variolapusteln gefundenen Bakterien dürften entweder von Anfang an in der geimpften Lymphe vorkommen oder sekundär in die Pusteln eingewandert sein.

Meiner Ansicht nach ist die Frage, ob irgend ein Mikroorganismus als Variola- oder Vaccineerreger zu betrachten ist, immer noch als offen anzusehen.

Der Zufall, daß ein an exsudativer Pleuritis leidender Wanderpriester (Rokubu) am 9. Juni 1898 mich konsultierte, brachte mir endlich Klarheit. Es handelte sich um einen 30-jährigen Mann von starkem Körperbau, namens Shigeru Fujii aus Tokushima-Ken. Er litt auf seiner religiösen Reise nach verschiedenen heiligen Orten an Atemnot und bat mich um unentgeltliche Verpflegung und Behandlung. Ich fand bei ihm Pleuritis exsudativa sinistra, wodurch die Atemnot aufs äußerste getrieben wird. Durch Punktion der linken Pleurahöhle wurden etwa 3 l einer gelblich-grünen, klaren Flüssigkeit entleert. Da das Exsudat vollkommen klar und durchsichtig war, kam ich auf den Gedanken, daraus irgend welche Mikroorganismen zu kultivieren. Ich nahm daher 500 g davon in einen sterilisierten gleichgroßen Kolben, verteilte wiederum in einige sterile 30 g-haltige Fläschchen und verstopfte jedes mit keimfreien Wattebäuschchen. Nach einiger Zeit bildete sich in der Mitte des Exsudates in den Kolben und Fläschchen ein gallertiges Gerinnsel, welches von der klaren Flüssigkeit umgeben war. Am 14. Juni 1898 (also 5 Tage nach der Entleerung) tröpfelte ich von einer Kapillarröhre 0,06 g sehr guter Retrovaccinationslymphe (hergestellt in dem Regierungsimpfinstitut zu Tokyo, dreifach zu 40 Proz. mit Glycerin verdünnt) in das eine Fläschchen ein, und stellte dasselbe im Brutschrank auf. Als ich es nach einigen Tagen betrachtete, fand ich die in das Fläschchen eingetröpfelte Lymphe auf dem gallertigen Gerinnsel von der durchsichtigen Flüssigkeit umgeben sehnig weiß, wie gekocht, in eine geronnene Masse verwandelt, so daß sie beim Schütteln des Fläschchens nicht in der Flüssigkeit zerstreut wird, während das Exsudat, wie früher, unveränderlich blieb. Dieses Phänomen, daß die Vaccinelymphe in diesem Exsudate wie gekocht und weiß geronnen aussah, war mir unbegreiflich. Nach reiflicher Ueberlegung fiel mir nach einiger Zeit ein, daß das Gesicht des Patienten mit bedeutenden Pockennarben besetzt war. Und er selbst gab auf meine Anfrage an, er hätte etwa vor 25 Jahren an schweren Pocken gelitten. Diese Thatsache erweckte mein Interesse und trieb mich seither zur fortgesetzten Untersuchung nach dieser Richtung an. Ich hatte nämlich öfters beobachtet, daß die

Pfeiffer, L., Behandlung und Prophylaxe der Blattern. (Penzoldt, F., Stintzing, R., Handbuch der speziellen Therapie etc. Bd. I. 1894. p. 218.)

1) Hückel, A., Die Vaccinekörperchen. Nach Untersuchungen an der geimpften Hornhaut des Kaninchens. 1898.

Vaccinelymphe in den Ascites- und Hydrocelenflüssigkeiten, sowie Pleuritisexsudaten, welche von Personen stammten, die nicht an Pocken gelitten hatten, nicht imstande war, zu gerinnen.

Dieses Koagulationsphänomen der Vaccinelymphe in dem Exsudat der an Pocken erkrankten Person durfte mit großer Wahrscheinlichkeit auf eine der Pfeiffer-Gruber-Widal'schen Reaktion identische Erscheinung zurückgeführt werden. Ich schließe daraus, daß die bis jetzt betreffs des Vaccine- resp. Variolaerregers geäußerten Ansichten nicht der Thatsache entsprechen und daß der Pockenerreger homogen und strukturlos, analog der Lymphe selbst sich überall darin verbreiten muß. Daß die bisherigen Forscher vergebens den Pockenerreger als geformte Elemente in der äußerst geringen Lymphe auf der Lanzette- oder Nadelspitze zu suchen sich bemühten, war in erster Linie irreführend. Bei der Ausführung der Vaccination wird eine Lanzette oder Nadelspitze mit Lymphe benetzt und die letztere in die Schnittöffnungen hineingestrichen. Dieser Vorgang ist meiner Ansicht nach nichts anderes, als daß ein Stückchen des Pockenerregers abgerissen und in die gemachten Skarifikationen eingebracht wird. Diese Teilbarkeit des Pockenerregers kommt bekanntlich den Plasmodien zu. Zopf[1]) schreibt nämlich: „Höchst bemerkenswert erscheint ferner die Thatsache der künstlichen Teilbarkeit der Plasmodien, wie sie für die höheren Mycetozoen ja längst bekannt ist und von Häckel auch für Protomyxa aurantiaca und Myxastrum radians in Anwendung gebracht wurde. Die Teilstücke bleiben vollkommen lebensfähig, auch wenn man die Fragmentation ziemlich weit treibt: jedes Teilstück verhält sich des weiteren wie ein Plasmod, kriecht umher, nimmt Nahrung auf etc." Auch erwähnt de Bary[2]): „Hier wachsen zwei Aeste gegeneinander, bis sie sich berühren und zu einer Anastomose verschmelzen; dort schnürt sich ein Ast irgendwo ein bis zur Trennung in zwei Stücke. Durch diese Vorgänge kann ein Plasmodium in mehrere getrennt und mehrere zu einem vereinigt werden; doch findet nach Cienkowski's und meinen Beobachtungen die Vereinigung niemals zwischen Plasmodien verschiedener Species statt."

Leider sind wir beim jetzigen Stande unseres Wissens noch nicht imstande, die organischen Lebenserscheinungen des Pockenerregers näher kennen zu lernen. Vielleicht könnte derselbe im Vergleich zu den Moneren Haeckel's[3]) noch bedeutend feiner und kunstvoller gebildet sein. Diese Mikroorganismen dürften anscheinend eine strukturlose, homogene Masse sein, und wenn sie mit Lymphe oder Glycerin oder Wasser gemischt und darin zerteilt werden, würde man sie voneinander nicht unterscheiden können. Gegenwärtig läßt sich der Erreger nur durch die oben auseinandergesetzten Koagulationsphänomene annehmbar machen. Nebenbei sei bemerkt, daß man bei diesem Versuche der Koagulationsreaktion der Schwere der Pockenerkrankung und der Menge des Exsudates große Aufmerksamkeit schenken muß.

---

1) Zopf, W., Die Pilztiere oder Schleimpilze 1885. p. 31.

2) Bary, De, Vergleichende Morphologie und Biologie der Pilze. 1884. p. 458. Vergl. de Bary, Die Mycetozoen. 1864. 2. Aufl. p. 40.

3) Haeckel, E., Anthropogenie des Menschen. 1891. 4. Aufl. p. 481. — Vergl. O. Bütschli, Protozoa. Bd. I. Abteilung I. p. XI, 14, 176. (H. G. Bronn's Klassen und Ordnungen des Tierreiches.)

Zur Erforschung der Immunität durch die Vaccination.

Von Dr. **Keïsuke Tanaka.**

Zur Zeit von Pockenepidemieen ist es von Wichtigkeit, zu ermitteln, am wievielten Tage nach der Vaccination etwa die Immunität eintritt. Um dies festzustellen, habe ich Erstimpflinge zuerst an dem einen Oberarm und danach mit einer Zwischenzeit von 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 Tagen an dem anderen Oberarm vacciniert; die erstere nenne ich Vorimpfung, die letztere Nachimpfung. Die Efflorescenzen der Nachimpfung sind nicht so gut entwickelt wie diejenigen der Vorimpfung, sondern befinden sich im verkümmerten Zustande infolge der bereits mehr oder minder geschaffenen Immunität. Wo die Nachimpfung ganz und gar fehlschlägt, da tritt gerade die Immunität vollkommen in Kraft. Wie aus der nachstehenden Tabelle ersichtlich ist, sind die Efflorescenzen der Nachimpfung schon am 4. Tage wie diejenigen der Vorimpfung nicht gut gediehen, und in den nächstfolgenden Tagen beginnen dieselben allmählich zu verkümmern. Etwa am 9. Tage nach der Impfung tritt schließlich fast vollkommene Immunität ein, so daß die Nachimpfung hier kaum mehr entwickelungsfähig wird. Bei der Vaccination hatte ich von der gleichnumerischen Retrovaccinationslymphe des Regierungsimpfinstitutes zu Tokyo Gebrauch gemacht, und zwar habe ich die Impfung nach der Schnittmethode ausgeführt. Hierbei sei noch bemerkt, daß nach der Art der Lymphe sowie nach der Impfmethode der Tag der vollkommenen Immunität um einige Tage schwanken kann.

Nachimpfung am 4. Tage.

M. S., 2-jähr. Mädchen	Vorimpfung 12. Mai 1900. Am linken Oberarm 6 Pusteln voll entwickelt. Nachimpfung 15. Mai 1900. Am rechten Oberarm 3 Pusteln schwach entwickelt, 3 erfolglos.
Y. N., 2-jähr. Mädchen	Vorimpfung 2. Mai 1900. Am linken Oberarm 5 Pusteln voll entwickelt. Nachimpfung 5. Mai 1900. Am rechten Oberarm 2 Pusteln klein und schwach entwickelt, 3 unentwickelt.
C. Y., 2-jähr. Knabe	Vorimpfung 12. Mai 1900. Am rechten Oberarm 6 Pusteln voll entwickelt. Nachimpfung 15. Mai 1900. Am linken Oberarm 5 Pusteln klein und schwach entwickelt, 1 erfolglos.
T. Y., 2-jähr. Knabe	Vorimpfung 17. Mai 1901. Am linken Oberarm 6 Pusteln voll entwickelt. Nachimpfung 20. Mai 1901. Am rechten Oberarm 6 Pusteln schwächlich entwickelt.

Nachimpfung am 5. Tage.

G. H., 3-jähr. Knabe	Vorimpfung 15. Mai 1901. Links 6 Pusteln voll entwickelt. Nachimpfung 19. Mai 1901. Rechts 7 Pusteln schwach entwickelt.
S. K., 3-jähr. Knabe	Vorimpfung 15. Mai 1901. Links 4 Pusteln voll entwickelt. Nachimpfung 19. Mai 1901. Rechts 4 Pusteln schwach entwickelt.
K. Y., 3-jähr. Knabe	Vorimpfung 15. Mai 1901. Links 6 Pusteln voll entwickelt. Nachimpfung 19. Mai 1901. Rechts 6 Pusteln kleiner entwickelt.

K. K., 2-jähr. Mädchen	Vorimpfung 15. Mai 1901. Links 5 Pusteln voll entwickelt. Nachimpfung 19. Mai 1901. Rechts 2 Pusteln klein und schwach entwickelt, 3 unentwickelt.
Y. J., 2-jähr. Knabe	Vorimpfung 15. Mai 1901. Links 6 Pusteln voll entwickelt. Nachimpfung 19. Mai 1901. Rechts 6 Pusteln klein und schwächlich entwickelt.
H. M., 4-jähr. Knabe	Vorimpfung 15. Mai 1901. Links 6 Pusteln voll entwickelt. Nachimpfung 19. Mai 1901. Rechts 6 Pusteln klein und schwach entwickelt.
N. T., 3-jähr. Mädchen	Vorimpfung 15. Mai 1901. Links 4 Pusteln voll entwickelt. Nachimpfung 19. Mai 1901. Rechts 6 Pusteln etwas kleiner entwickelt.

Nachimpfung am 6. Tage.

S. W., 6-jähr. Mädchen	Vorimpfung 15. Mai 1901. Links 2 Pusteln voll entwickelt, andere erfolglos. Nachimpfung 20. Mai 1901. Rechts fehlgeschlagen.
Y. W., 5-jähr. Mädchen	Vorimpfung 15. Mai 1901. Links 5 Pusteln voll entwickelt. Nachimpfung 20. Mai 1901. Rechts erfolglos.
S. S., 2-jähr. Mädchen	Vorimpfung 15. Mai 1901. Links 5 Pusteln voll entwickelt. Nachimpfung 20. Mai 1901. Rechts 2 Knötchen, andere erfolglos.
Y. A., 2-jähr. Knabe	Vorimpfung 15. Mai 1901. Links 6 Pusteln voll entwickelt. Nachimpfung 20. Mai 1901. Rechts 5 Pusteln sehr schwach entwickelt, 1 erfolglos.
U. W., 2-jähr. Knabe	Vorimpfung 15. Mai 1901. Links 5 Pusteln voll entwickelt. Nachimpfung 20. Mai 1901. Rechts 6 Pusteln schwächlich entwickelt.
Y. J., 3-jähr. Mädchen	Vorimpfung 17. Mai 1901. Links 6 Pusteln voll entwickelt. Nachimpfung 22. Mai 1901. Rechts 3 Pusteln schwach entwickelt, 3 erfolglos.
S. J., 3-jähr. Mädchen	Vorimpfung 17. Mai 1901. Links 6 Pusteln voll entwickelt. Nachimpfung 22. Mai 1901. Rechts 6 Pusteln schwächlich entwickelt.
J. K., 2-jähr. Knabe	Vorimpfung 17. Mai 1901. Links 5 Pusteln voll entwickelt. Nachimpfung 22. Mai 1901. Rechts 6 Pusteln schwächlich entwickelt.
T. K., 6-jähr. Mädchen	Vorimpfung 17. Mai 1901. Links 8 Pusteln voll entwickelt. Nachimpfung 22. Mai 1901. Rechts 8 Pusteln schwächlich entwickelt.

Nachimpfung am 7. Tage.

T. N., 3-jähr. Mädchen	Vorimpfung 15. Mai 1901. Links 6 Pusteln voll entwickelt. Nachimpfung 21. Mai 1901. Rechts fehlgeschlagen.
K. K., 3-jähr. Mädchen	Vorimpfung 15. Mai 1901. Links 6 Pusteln voll entwickelt. Nachimpfung 21. Mai 1901. Rechts 6 Pusteln schwach entwickelt.
S. J., 2-jähr. Mädchen	Vorimpfung 15. Mai 1901. Links 6 Pusteln voll entwickelt. Nachimpfung 21. Mai 1901. Rechts erfolglos.
S. J., 2-jähr. Mädchen	Vorimpfung 17. Mai 1901. Links 5 Pusteln voll entwickelt. Nachimpfung 23. Mai 1901. Rechts erfolglos.
S. N., 2-jähr. Mädchen	Vorimpfung 17. Mai 1901. Links 5 Pusteln voll entwickelt. Nachimpfung 23. Mai 1901. Rechts fehlgeschlagen.
H. T., 2-jähr. Mädchen	Vorimpfung 17. Mai 1901. Links 4 Pusteln voll entwickelt. Nachimpfung 23. Mai 1901. Rechts erfolglos.
T. J., 2-jähr. Knabe	Vorimpfung 17. Mai 1901. Links 4 Pusteln voll entwickelt. Nachimpfung 23. Mai 1901. Rechts 2 Knötchen, andere erfolglos.

S. N., 1-jähr. Mädchen	Vorimpfung 17. Mai 1901. Links 2 Pusteln voll entwickelt, 1 erfolglos. Nachimpfung 23. Mai 1901. Rechts fehlgeschlagen.
K. H., 8-jähr. Knabe	Vorimpfung 17. Mai 1901. Links 7 Pusteln voll entwickelt. Nachimpfung 23. Mai 1901. Rechts erfolglos.
K. S., 6-jähr. Knabe	Vorimpfung 17. Mai 1901. Links 6 Pusteln voll entwickelt. Nachimpfung 23. Mai 1901. Rechts fehlgeschlagen.
K. S., 10-jähr. Mädchen	Vorimpfung 17. Mai 1901. Links 5 Pusteln voll entwickelt. Nachimpfung 23. Mai 1901. Rechts 6 kleine Bläschen.
S. J., 3-jähr. Knabe	Vorimpfung 17. Mai 1901. Links 5 Pusteln voll entwickelt. Nachimpfung 23. Mai 1901. Rechts erfolglos.
N. J., 7-jähr. Knabe	Vorimpfung 17. Mai 1901. Links 4 Pusteln voll entwickelt. Nachimpfung 23. Mai 1901. Rechts erfolglos.
N. J., 2-jähr. Mädchen	Vorimpfung 17. Mai 1901. Links 4 Pusteln voll entwickelt. Nachimpfung 23. Mai 1901. Rechts 5 sehr kleine Bläschen.
S. O., 2-jähr. Knabe	Vorimpfung 17. Mai 1901. Links 4 Pusteln voll entwickelt. Nachimpfung 23. Mai 1901. Rechts 5 sehr kleine Bläschen.
N. S., 2-jähr. Knabe	Vorimpfung 17. Mai 1901. Links 4 Pusteln voll entwickelt. Nachimpfung 23. Mai 1901. Rechts 2 Knötchen, andere erfolglos.
S. J., 6-jähr. Mädchen	Vorimpfung 17. Mai 1901. Links 3 Pusteln voll entwickelt. Nachimpfung 23. Mai 1901. Rechts fehlgeschlagen.
Y. N., 3-jähr. Mädchen	Vorimpfung 4. Mai 1901. Rechts 7 Pusteln voll entwickelt. Nachimpfung 10. Mai 1901. Links 6 sehr kleine Bläschen.
J. A., 3-jähr. Mädchen	Vorimpfung 4. Mai 1901. Links 7 Pusteln voll entwickelt. Nachimpfung 10. Mai 1901. Rechts erfolglos.
	Nachimpfung am 8. Tage.
Y. W., 2-jähr. Mädchen	Vorimpfung 15. Mai 1901. Links 6 Pusteln voll entwickelt. Nachimpfung 22. Mai 1901. Rechts erfolglos.
T. A., 5-jähr. Mädchen	Vorimpfung 15. Mai 1901. Links 4 Pusteln voll entwickelt. Nachimpfung 22. Mai 1901. Rechts 2 sehr kleine Bläschen, andere erfolglos.
R. J., 2-jähr. Knabe	Vorimpfung 17. Mai 1901. Links 5 Pusteln voll entwickelt. Nachimpfung 24. Mai 1901. Rechts erfolglos.
K. K., 2-jähr. Mädchen	Vorimpfung 20. Mai 1901. Rechts 5 Pusteln voll entwickelt. Nachimpfung 27. Mai 1901. Links fehlgeschlagen.
	Nachimpfung am 9. Tage.
K. S., 3-jähr. Knabe	Vorimpfung 15. Mai 1901. Links 3 Pusteln voll entwickelt. Nachimpfung 23. Mai 1901. Rechts erfolglos.
H. S., 2-jähr. Knabe	Vorimpfung 17. Mai 1901. Links 5 Pusteln voll entwickelt. Nachimpfung 25. Mai 1901. Rechts unentwickelt.
J. Y., 4-jähr. Knabe	Vorimpfung 17. Mai 1901. Links 5 Pusteln voll entwickelt. Nachimpfung 25. Mai 1901. Rechts erfolglos.
U. F., 2-jähr. Knabe	Vorimpfung 17. Mai 1901. Links 5 Pusteln voll entwickelt. Nachimpfung 25. Mai 1901. Rechts fehlgeschlagen.
R. O., 5-jähr. Knabe	Vorimpfung 19. Mai 1901. Links 6 Pusteln voll entwickelt. Nachimpfung 27. Mai 1901. Rechts erfolglos.
T. N., 3-jähr. Knabe	Vorimpfung 4. Mai 1901. Rechts 6 Pusteln voll entwickelt. Nachimpfung 12. Mai 1901. Links erfolglos.
M. Y., 2-jähr. Knabe	Vorimpfung 4. Mai 1901. Links 6 Pusteln voll entwickelt. Nachimpfung 12. Mai 1901. Rechts erfolglos.
H. Y., 19-jähr. Mädchen	Vorimpfung 4. Mai 1901. Links 10 Pusteln voll entwickelt. Nachimpfung 12. Mai 1901. Rechts erfolglos.

	Nachimpfung am 10. Tage.
M. K., 8-jähr. Knabe	Vorimpfung 19. Mai 1901. Links 6 Pusteln voll entwickelt. Nachimpfung 28. Mai 1901. Rechts fehlgeschlagen.
T. K., 5-jähr. Mädchen	Vorimpfung 19. Mai 1901. Links 6 Pusteln voll entwickelt. Nachimpfung 28. Mai 1901. Rechts unentwickelt.
	Nachimpfung am 11. Tage.
J. J., 2-jähr. Knabe	Vorimpfung 17. Mai 1901. Links 5 Pusteln voll entwickelt. Nachimpfung 27. Mai 1901. Rechts erfolglos.
M. K., 3-jähr. Knabe	Vorimpfung 17. Mai 1901. Links 5 Pusteln voll entwickelt. Nachimpfung 27. Mai 1901. Rechts erfolglos.
J. N., 19-jähr. Mädchen	Vorimpfung 4. Mai 1901. Links 7 Pusteln voll entwickelt, 3 verkümmert. Nachimpfung 14. Mai 1901. Rechts erfolglos.

Ueber den antiseptischen Wert des Argentum colloïdale Credé und seine Wirkung bei Infektion[1].

[Aus dem kgl. hygienischen Institute zu Königsberg i. Pr. (Direktor: Prof. Dr. R. Pfeiffer.)]

Von Dr. **Ernst Cohn** in Königsberg i. Pr.

Die Frage, ob die bisher bekannten Antiseptika auch die Fähigkeit besitzen, in den Organismus eingeführt, in Fällen, in denen die Ansiedelung der Bakterien sich nicht allein auf den Locus infectionis beschränkte, sondern dieselben vielmehr den Körper nach Durchbrechung seiner natürlichen Schutzwälle auf dem Wege der Lymph- und Blutbahn überschwemmt haben, ebenso wie im Reagensglase ihre antibakteriellen Wirkungen zu entfalten und so eine allgemeine Desinfektion des Körpers herbeizuführen, ist in negativem Sinne entschieden worden, und zwar zuerst von Behring[2]), der milzbrandkranken Tieren Sublimat im Verhältnis von 1:500000 des resp. Körpergewichtes intravenös ohne den geringsten Heilerfolg injizierte. In neuerer Zeit kam man zu gleichen Ergebnissen gelegentlich der Nachprüfung des von Baccelli gemachten Vorschlages, endovenöse Sublimatinjektionen zur Behandlung der Syphilis und anderer menschlicher wie tierischer Infektionskrankheiten — von letzteren besonders der Klauenseuche — anzuwenden. Der Grund der Mißerfolge war offenbar darin zu suchen, daß die bisherigen Antiseptika, und speziell das Sublimat, wie Behring nachgewiesen hat, gegen die Körperzellen bedeutend giftiger sind als gegen die Bakterienzelle, und infolgedessen nur in so außerordentlich starken Verdünnungen innerlich gegeben werden konnten, daß von einer baktericiden Wirkung kaum die Rede war. Hinzu kam ferner noch der die antibakteriellen Eigenschaften der Antiseptika schwächende Einfluß der Körperflüssigkeiten, insbesondere des Blutserums, wie er von Behring für das Sublimat mit Sicherheit nachgewiesen ist.

---

1) Als Dissertation erschienen am 15. Juli 1902.

2) Behring, Bekämpfung der Infektionskrankheiten. — Infektion und Desinfektion. Leipzig 1894. p. 35.

Da führte im Jahre 1897 Dr. B. Credé aus Dresden ein neues Silberpräparat in die Therapie ein, das die genannten Mängel der bisherigen Antiseptika nicht teilen sollte. Er bezeichnete es als Argentum colloïdale oder lösliches Silber, da es die Fähigkeit besitzt, sich in Wasser zu lösen.

Schon 2 Jahre früher hatte er bereits das metallische Silber und einige Salze desselben, das Aktol oder milchsaure und das Itrol oder citronensaure Silber als stark antiseptische Mittel, die sich vorzüglich zur Wundbehandlung eigneten, empfohlen. Da sich die genannten Silberpräparate als gänzlich ungiftig erwiesen, war es naheliegend, daß ihm der Gedanke kam, es ließe sich mit diesen Mitteln vielleicht das Ideal der antiseptischen Behandlung, die allgemeine Körperdesinfektion, erreichen. Langdauernde Versuche zeigten, daß beide Mittel zwar zur lokalen Antisepsis außerordentlich geeignet waren, sich für alle diejenigen Fälle aber, in denen es darauf ankam, die im Blut- und Lymphstrom kreisenden Bakterien zu vernichten, als unanwendbar erwiesen. Injektionsversuche nämlich, welche Credé mit Aktol anstellte, hatten bei Anwendung konzentrierterer Lösungen am Orte der Einspritzung Eiweißgerinnungen zur Folge, welche den größten Teil des eingespritzten Aktols an dieser Stelle festlegten; der kleine, in die Blutbahn gelangende Rest war natürlich viel zu geringfügig für eine allgemeine Blutdesinfektion. Ebenso zeigten die Untersuchungen von Marx[1]), die derselbe an Meerschweinchen anstellte, daß eine Lösung des Aktols im cirkulierenden Serum, wie sie zu allgemeiner Körperdesinfektion nötig wäre, nicht stattfindet. Mit den Salzen war es also nichts.

Da nun aus Versuchen Anderer und aus eigenen bekannt war, daß metallisches Silber als solches imstande war, unter Einfluß der Kokken Salze zu bilden, so konnte es möglich sein, daß metallisches Silber direkt ins Blut und die Säfte gebracht, daselbst antiseptische Salze oder andere Stoffe bilden würde, die baktericide Wirkungen entfalten und eine allgemeine Körperdesinfektion herbeiführen könnten. Voraussetzung zu dieser Hypothese war, daß Silber sich in tierischen Flüssigkeiten löste. Ein solches Silber gab es jedoch noch nicht, und Credé bemühte sich daher, eine Modifikation des Metalles, die in Wasser oder eiweißhaltigen Flüssigkeiten löslich war, zu erhalten. Resultat dieser außerordentlich langwierigen Forschungen war die Entdeckung des oben erwähnten Argentum colloïdale oder Collargol, wie es von der Fabrik von Heyden, die es herstellte, benannt wurde.

Dieses merkwürdige Präparat war indessen, wie Düsterbehn[2]) berichtet, schon früher dargestellt worden, und zwar sowohl von Wöhler und Bibra als auch von einem amerikanischen Chemiker, Carey Lea, der von Lottermoser[3]) als der eigentliche Entdecker des Argentum colloïdale bezeichnet wird.

Man erhält es[2]) durch Reduktion einer mit citronensaurem Ammon im Ueberschuß versetzten Lösung von salpetersaurem Silber mittels Eisenvitriols, wobei sich das Argentum colloïdale als feiner schwarzer Niederschlag abscheidet. Der Niederschlag wird, nachdem die überstehende Flüssigkeit abgehebert ist, mittels porösen Thonfilters abgesaugt und im Vakuum über roher Schwefelsäure getrocknet. In diesem

---

1) Marx, E., Experimentaluntersuchungen für allgemeine Körperdesinfektion durch Aktol. (Centralbl. f. Bakt. etc. Bd. XXI. 1897.)

2) Lösliches metallisches Silber. (Apothekerztg. 1897. No. 88.)

3) Lottermoser, l. c.

Zustande bildet das Collargol dunkelschwarzgrüne Stückchen von deutlichem Metallglanz und nicht allzufester Konsistenz — die Stückchen lassen sich mit der Pincette zusammendrücken — welche sich in destilliertem Wasser mit tief schwarzbrauner Farbe mit einem Stich ins Grünliche lösen. Die Lösungen sind selbst in Konzentrationen, wie 1 : 5000, vollkommen undurchsichtig, tintenähnlich. Nach Bredig gelingt es, ähnliche Silberlösungen zu erhalten, wenn man das Metall unter Wasser elektrisch zerstäubt. Die so erhaltenen Lösungen sind grünbraun und enthalten das Metall in nicht so feiner Verteilung wie die nach der ersterwähnten Methode erhaltenen. Lottermoser und v. Meyer, sowie eine Reihe anderer bekannter Chemiker haben sich mit diesem chemisch überaus interessanten Körper sehr eingehend beschäftigt und eine Reihe merkwürdiger chemisch-physikalischer Eigenschaften desselben aufgedeckt. Näheres über die Resultate dieser Arbeiten hier mitzuteilen, geht über den Rahmen dieser Arbeit hinaus. Erwähnt sei nur noch, daß das kolloïdale Silber die bekannten Reaktionen des gewöhnlichen metallischen Silbers nicht giebt; vielmehr konnte ich gelegentlich anderer Untersuchungen, die ich im hiesigen pharmakologischen Institute unter gütiger Aufsicht des Assistenten desselben, Herrn Privatdocenten Dr. Ellinger, ausführte, folgendes eigentümliche Verhalten des Collargols beobachten. Das Argentum colloïdale löst sich in Salpetersäure allein nur zum geringen Teil schwer auf, ebenfalls in Salzsäure allein. Dagegen im Gemisch von Salpetersäure und Salzsäure löst es sich unter Chlorentwickelung mit gelbgrüner Farbe beim Erwärmen. Beim Erkalten, noch mehr auf Wasserzusatz, fällt ein Niederschlag von unter dem Mikroskope sternförmigen Krystallen aus. Dieser Niederschlag löst sich beim Erwärmen wieder und fällt auf Wasserzusatz wieder reichlich aus. Der Niederschlag ist in Ammoniak löslich; aus dieser Lösung kann er durch Uebersättigung mit Salpetersäure ausgefällt werden. Die Reaktion des Collargols ist also im Vergleich zu der gewöhnlichen des metallischen Silbers stark modifiziert.

Nachdem das lösliche Silber also in Credé's Hände gelangt war, entstand für ihn die Frage, in welcher Weise es am besten angewandt werden könnte. Er entschied sich zunächst für die Inunktion des Mittels, das er in Salbenform herstellen ließ. In dieser Weise verwendete er es in zahlreichen Fällen von Lymphangitis, Phlegmone, Septikämie und septischen Prozessen, die in Gemeinschaft mit anderen Infektionskrankheiten auftraten, z. B. mit Scharlach, Diphtherie, Erysipel u. s. w., und kam übereinstimmend mit einer Reihe von Autoren, die genau nach seiner Anweisung verfuhren, zu anscheinend sehr guten Resultaten. So sollte im akuten Stadium fast stets eine einzige Einreibung genügen, um innerhalb 24—36 Stunden die Infektion zu beseitigen oder doch zu mildern.

Etwa ein halbes Jahr später[1]) berichtet Credé über weitere Erfahrungen mit besonderer Berücksichtigung der Indikationsstellung und Anwendungsform. Deutliche Heilwirkungen ließe das Silber in der Hauptsache nur den durch Staphylokokken und Streptokokken verursachten Infektionen gegenüber erkennen. — Eine eigentliche Heilung der Erkrankung erschiene nur dann möglich, wenn dieselbe nicht be-

———

1) Lösliches Silber als Heilmittel. (Klin.-therapeut. Wochenschr. 1898. No. 14.)

reits zu weit vorgeschritten wäre. Als Anwendungsform empfiehlt er entweder die Salbenform, Unguentum Credé, welche 15 Proz. Collargol enthält. Die Einreibungen erfolgen zu 1,0—3,0 pro dosi 1—2mal täglich auf die gesunde Haut möglichst intensiv, da bei gründlichem Einreiben — ein solches erfordert 20—30 Minuten — etwa $^2/_3$ der Salbe von der Haut aufgenommen werden.

Eine zweite Anwendungsform ist die Pille, welche 0,01 Collargol enthält, und von ihm bei leichter oder chronischer Sepsis empfohlen wird, wo die Einreibung sehr lange fortgesetzt werden müßte. Eine andere Art von Pillen, 0,05 Arg. colloïdale enthaltend, benutzt er zu chirurgischen Zwecken, wie zum Einlegen in Wunden, in die Bauchhöhle bei komplizierten Eingriffen prophylaktisch oder bei schon vorhandener Entzündung, in den Uterus u. s. w. Gleichen und ähnlichen Zwecken dienen die Bacilli arg. colloïdal., mit einem Gehalte von 0,2 Argentum colloïdale.

Eine dritte Anwendungsform ist die Lösung, die er für Spülungen, subkutane und intravenöse Injektionen empfiehlt, letztere namentlich bei schwerer Sepsis, wo es gilt, rasch zu helfen (0,1 : 10—20 pro dosi).

Endlich verwendet er diese Lösungen auch zu innerlichem Gebrauche, nur müssen sie für diese Zwecke mit 1 Proz. frischem Eiweiß versetzt werden.

Diese mannigfachen Anwendungsformen hat Credé nicht nur empfohlen, sondern auch am Krankenbette geprüft und danach teilweise schöne Erfolge gesehen.

Natürlich mußten diese Mitteilungen überall das lebhafteste Interesse erregen und es bedurfte wohl kaum erst noch der Aufforderung Liebreich's[1]), „er halte das lösliche metallische Silber einer eingehenden Prüfung für wert". In verhältnismäßig kurzer Zeit erschien eine Reihe von Arbeiten, die bald die eine, bald die andere Wirkungsweise des Argentum colloïdale hervorhoben und mit Erfahrungen aus der Praxis zu belegen suchten. Es wäre müßig, an dieser Stelle ausführlich auf diese zum größten Teile aus Krankengeschichten bestehenden Mitteilungen einzugehen. Hier nur eine kurze Aufzählung der Krankheiten, welche man durch Inunktion mit der Salbe erfolgreich bekämpft haben wollte: Septische, akute und chronische Infektionen und Mischinfektionen, wie Lymphangitis, Phlegmone[1]), ferner Septikämie[2]), Meningitis cerebrospinalis epidemica[3]), Puerperalfieber[4]), Parametritis[5]), Endometritis[6]),

1) Werter, Deutsche med. Wochenschr. 1898. No. 40. — Wolfrom, Allg. med. Centralztg. 1898. No. 42. — Brown, Journal of nervous and mental disease. 1900. June. — Parsons, Medical Times and Register. 1899. No. 5. — Dworetzky, Therap. Monatshefte. 1900. Heft 3 und Klin.-therap. Wochenschr. 1901. No. 35 u. 36.
2) Werter, l. c. — Dworetzky, l. c. — Park, Roswell, in seiner Chirurgie unter der Ueberschrift „Die Wundfieber und septischen Infektionen".
3) Goffee, Riddle, Medical News. 1900. May. — Schirmer, New Yorker med. Wochenschr. Bd. X. 1898. No. 11.
4) Yones, The use of Credé's silver ointment in puerperal sepsis. 1899. — Steiger, Milwaukee med. Journ. 1899. June. — Polak, Brooklyn med. Journ. 1899. No. 10. [Sitzungsber. d. Brooklyner gynäkol. Gesellsch.] — Heinsheimer, Allg. med. Centralztg. 1900. No. 49. — Marx, S., Unguentum Credé in the treatment of puerperal fever. (Medical News. New York 1900. July.)
5) Polak, l. c.
6) Klien, Centralbl. f. Gynäkol. 1898. No. 10.

Erysipel [1]), Osteomyelitis [2]), Furunkulose [3]), Gelenkrheumatismus [4]), Empyem [5]) u. s. w., in neuerer Zeit auch noch Milzbrand [6]).

Ein besonders warmer Verfechter Credé's ist O. Werler. Für ihn unterliegt es keinem Zweifel mehr, „daß das Argentum colloïdale sich als spezifisches Mittel gegen Sepsis wirksam erzeigt". Wie Strohmayer [7]) sehr richtig bemerkt, ist man von dieser apodiktischen Sicherheit etwas überrascht, wenn man wenige Zeilen weiter unten lesen muß, daß sein einschlägiges kasuistisches Material allerdings vorläufig erst 3 Fälle von ausgesprochenen septischen Erkrankungsfällen betrifft. Die bisher aufgezählten Fälle beziehen sich ausschließlich auf Erfahrungen am Menschen.

In weit größerem Umfange aber ist das Collargol in der Veterinärmedizin angewandt worden. Gute Erfolge sah man hier nach intravenösen Injektionen auftreten bei Morbus maculosus der Pferde [8]), bei Phlegmone [9]), Druse [10]), Milzbrand [11]), bösartigem Katarrhalfieber der Rinder [12]) u. s. w., u. s. w. Ich habe bisher nur die günstigen Besprechungen aus der Litteratur erwähnt. Selbstverständlich mangelt es auch nicht an abfälligen Kritiken der Credé'schen Silbertherapie; von diesen will ich hier nur zwei besonders erwähnen. Die eine stammt von Strohmayer [13]), der im Diakonissenhaus zu Halle bei postpuerperalen, allgemeinen und lokalisierten septischen und pyämischen Prozessen multipler Furunkulose u. s. w. die Credé'sche Silbersalbe angewandt und damit eklatante Mißerfolge erlebt hat. Nur wenige Fälle verliefen günstig. Er faßt seine Erfahrungen mit den Worten zusammen: „Selbst unter meinen günstig verlaufenden Fällen der Silberbehandlung ist auch bei mildester Beurteilung keiner, durch den unwiderleglich der Beweis erbracht wäre, daß der schließliche Erfolg einzig und allein auf Konto der Salbenbehandlung zu setzen sei .... In den Fällen, wo die Salbe hätte zeigen können, daß sie — ihrer Empfehlung entsprechend — etwas, und zwar von den bisherigen Heilfaktoren nicht Erreichtes zu leisten imstande sei, hat sie nach meinen Erfahrungen versagt."

Die andere stammt aus neuester Zeit und findet sich in dem Vortrage von Osterloh, dem Gynäkologen am Dresdener Stadtkrankenhause, welchen derselbe in der Gesellschaft für Natur- und Heilkunde zu Dresden im März d. J. über „Beiträge zur Behandlung der puerperalen Sepsis" hielt [14]). Schon früher hätte er sich von der Nutzlosigkeit der Anwendung der Credé'schen Silbersalbe bei schwerer puerperaler Sepsis überzeugen müssen, wo der Tod durch sie nicht aufge-

---

1) Dworetzky, l. c. — Park, l. c. unter Erysipel.
2) Dworetzky, l. c.
3) Wolfrom, Allg. med. Centralztg. 1898. No. 42. — Werler, l. c. — Dworetzky, l. c. — Kronfeld, Deutsche med. Ztg. 1900. No. 92.
4) v. Niessen, Wiener med. Wochenschr. 1899. No. 44 u. 45.
5) Witthauer, Krankenbericht der Diakonissenanstalt Halle a. S. für 1899.
6) Fischer, Münchener med. Wochenschr. 1901. No. 47.
7) Strohmayer, W., Die therapeutischen Erfolge mit Unguentum arg. coll. Credé. (Münch. med. Wochenschr. 1900. No. 31.)
8) Diekerhoff, Berl. tierärztl. Wochenschr. 1898. No. 46. — Kröning. Zeitschr. f. Veterinärkunde. 1899. No. 3.
9) Träger, Zeitschr. f. Veterinärkunde. 1900. No. 5.
10) Diekerhoff, Berl. tierärztl. Wochenschr. 1899. No. 12.
11) Krüger, Berl. tierärztl. Wochenschr. 1899. No. 14.
12) Meissner, Berl. tierärztl. Wochenschr. 1899. No. 11.
13) Strohmayer, l. c.
14) Münch. med. Wochenschr. 1902. No. 21. p. 896.

halten zu werden vermochte. Hier berichtet er über 5 Fälle septischer Erkrankung, die mit intravenösen Injektionen von Argentum colloïdale behandelt wurden, deren erste sogar Credé selbst ausführte. Die Collargolbehandlung vermochte in der Mehrzahl der Fälle anscheinend zwar die Temperatur günstig zu beeinflussen, konnte aber die Krankheit selber nicht coupieren, die in 3 Fällen mit dem Tode endete, in den anderen beiden Fällen aber nach Sistierung der erfolglosen Silbertherapie durch andere Eingriffe (Absceßeröffnung u. s. w.) zur Heilung gelangte. — Osterloh äußert sich über das Mittel: „Ich kann in ihm nichts anderes finden als ein zwar unschädliches, aber nicht vielversprechendes Mittel gegen die puerperale Sepsis."

Soweit die klinischen Erfahrungen mit dem Collargol. Man sieht, die Feuerprobe hat das Mittel noch nicht bestanden, und von einer absolut sicheren Heilwirkung bei den nach der Credé'schen Indikationsstellung in Frage kommenden Krankheitsprozessen ist eigentlich nicht die Rede. Es wäre daher auch gänzlich verkehrt, wollte man aus den anscheinend positiven Heilerfolgen den Schluß ziehen, daß dieselben wirklich einzig und allein auf das Argentum colloïdale zurückzuführen seien. Die Beweiskraft solcher klinischen Experimente steht eben auf sehr schwachen Füßen, denn abgesehen von Irrtümern in der Diagnose bietet der Krankheitsverlauf selber durch sein so außerordentlich wechselvolles Bild eine ständige, sehr schwer, oft gar nicht zu vermeidende Fehlerquelle für die Beurteilung der Heilwirkung eines Mittels dar. Ich erinnere nur daran, wie mannigfaltig sich im klinischen Bilde eine Sepsis präsentieren kann, wie gar nicht so selten gerade bei dieser Krankheit nach einer mehr oder weniger langen Zeit schwerster Fieberzustände plötzlich die Temperatur sinken, der Patient zur Genesung kommen kann, ohne daß irgend eine Arznei angewandt worden wäre. Hieraus erhellt, wie falsch der Grundsatz post hoc, ergo propter hoc ist, der sich wie ein roter Faden durch die gesamte erwähnte Litteratur über das Collargol zieht und eigentlich nichts weiter ist als die rein subjektive Ansicht des Autors über die Wirkung des von ihm gerade angewandten Mittels. Nein, sollte wirklich einwandsfrei der Beweis erbracht werden, daß das Argentum colloïdale ein Spezifikum gegen Sepsis und gegen andere lokale und allgemeine Infektionen ist, so mußte man zum mindesten das Tierexperiment heranziehen, bei dem die genannten Fehlerquellen vermieden werden, und man eine sichere Kontrolle über alle, auch die geringsten Wirkungen des angewandten Arzneikörpers in der Hand hat. Verfolgt man nach diesen Gesichtspunkten hin die einschlägige Litteratur bis in die neueste Zeit, so ist man erstaunt, um nicht zu sagen befremdet, über die Thatsache, in der unglaublich umfangreichen, das Mittel mit einer apodiktischen Sicherheit als Panacee für alle möglichen Erkrankungen preisenden Litteratur nur eine verschwindend kleine Anzahl von Arbeiten zu finden, die auf experimentellem Wege die Wirkungsweise des löslichen Silbers auf den Organismus, auf die Bakterien und auf den Verlauf der Infektion aufzuklären versucht.

Noch erstaunlicher freilich ist es, daß Credé selber, der Schöpfer dieser neuen Therapie, in der ganzen mir zugänglichen Litteratur nichts von eigenen Tierexperimenten bezüglich der Wirkung seines löslichen Silbers bei Infektion erwähnt, sondern vielmehr gesteht[1]), „daß ihm die

1) Berl. klin. Wochenschr. 1901. No. 37.

Erfahrung des tierärztlichen Docenten, die sich bereits in günstigerem Sinne auf mehrere Erkrankungsformen der großen Haustiere erstrecken, von allergrößtem Werte waren, da ihm durch dieselben Experimente an Tieren erspart wurden, die man als Basis einer exakten Beobachtung sonst verlangen müßte. In ähnlicher Weise äußert sich sein Assistent Beyer[1]), welcher sich, abgesehen von einigen Tierversuchen, auf deren Beschreibung und Würdigung ich weiter unten ausführlich eingehen werde, gleichfalls auf Krankengeschichten aus Tierkliniken verlassen hat. Selbstverständlich gilt über die Beweiskraft derselben genau das Gleiche, was ich über diejenige der klinischen Erfahrungen am Menschen oben gesagt habe.

Es sei mir nun gestattet, im Folgenden kurz die Resultate der wenigen experimentellen Arbeiten, welche bisher über das Argentum colloïdale erschienen sind, kurz zusammenzustellen, um dann ausführlich meine eigenen Untersuchungen über die Wirkung desselben bei Infektionen am Tiere mitzuteilen.

Die Aufnahme des Silbers[2]) erfolgt
1) durch Einreibung in die Haut,
2) durch subkutane,
3) durch intravenöse Injektion,
4) durch den Verdauungskanal.

Was zunächst den ersten Punkt anlangt, so ist der unzweifelhafte Beweis einer Resorption durch die Haut von Klimmer[3]) erbracht worden, der in den inneren Organen einer mit Einreibungen der Silbersalbe behandelten Frau das Silber nachzuweisen vermochte. In welcher Weise die Aufsaugung stattfindet, ist noch nicht genügend aufgeklärt. Auf Schnitten sieht man das Silber in den oberen Epidermisschichten, in den Ausführungsgängen der Schweiß- und Talgdrüsen und um die Haarbälge herum[4]). Jedenfalls durchdringen Salbenfragmente vielfach die Schichten der Epidermis[5]).

Bei der subkutanen Einspritzung erfolgt die Resorption außerordentlich langsam, bei der Einführung durch den Verdauungskanal scheint sie außerordentlich gering zu sein.

Am schnellsten geht sie naturgemäß bei der intravenösen Einverleibung vor sich, welche dementsprechend auch am intensivsten wirken muß. Sie soll nach Professor Röder's Beobachtungen nach 4—5 Stunden eine längere Zeit anhaltende Temperatursteigerung zur Folge haben. Indessen hält Beyer[6]) diese Reaktion des Organismus nicht für eine spezifische Silberwirkung, da sie einmal nicht immer auftritt, dann aber auch bei der subkutanen Applikation fehlt und endlich deshalb, weil sie sich auch aus anatomischen Anhaltspunkten erklären läßt; so fand er z. B. bei einem gesunden Kaninchen, welches die Reaktion zeigte, Embolieen in den kleinsten Lungengefäßen. Beim Menschen pflegen die Temperatursteigerungen auszubleiben.

Was wird nun aus dem Silber, nachdem es auf einem der genannten Wege in den Körper gelangt ist? Auskunft hierüber geben

---

1) Münch. med. Wochenschr. 1902. No. 8. p. 332.
2) Münch. med. Wochenschr. 1902. No. 8. p. 332.
3) Jahresber. d. Dresdener gynäk. Gesellsch. v. 1900.
4) Cf. Sitzungsber. d. Gesellsch. f. Natur- u. Heilkunde zu Dresden. [Vortrag von Beyer.] (Münch. med. Wochenschr. 1902. No. 8.)
5) Baginsky, Ther. d. Gegenwart. 1900. No. 6.
6) Beyer, l. c.

die Arbeiten von Klimmer[1]) und von Lange[2]). Das Collargol wurde sowohl intravenös als auch subkutan einverleibt. In keinem Falle wurde Silber am Orte der Einführung niedergeschlagen, sondern vom Blute aufgenommen und durch den Körper verteilt. Mit Hilfe der von Kunz-Krause in Dresden ausgearbeiteten Methode des Silbernachweises in Organen, welche der Analyse die Verwendung konzentrierter Lichtstrahlen beifügt, um durch den Einfluß derselben selbst minimalste Spuren des gebildeten Chlorsilbers an dem Farbenwechsel (Schwärzung) wahrnehmen zu können, konnte folgendes festgestellt werden. Wurde das Tier 3 Stunden nach der Einführung des Collargols getötet, so fand sich Silber in minimalen Mengen im Blute, etwas reichlicher in Herz, Milz, Nieren, Dünndarm, Dickdarm und in großen Quantitäten endlich in Leber und Lunge. Erfolgte die Tötung nach 9 Tagen, so enthielten Milz, Darm, Nieren, Lungen und Herz Silber.

Bei einem Pferde, das 28 Tage nach intravenöser Injektion zur Sektion kam, war Silber in den Nieren nicht mehr nachweisbar.

Die Ausscheidung erfolgt anscheinend durch den Darm, für den Harn ist sie nicht nachgewiesen. Lange faßt die Resultate seiner Untersuchungen dahin zusammen, „daß im unmittelbaren Anschluß an die Einführung von kolloïdalem Silber eine allgemeine Verteilung über den Organismus durch den Blutstrom stattfindet, diese aber eine vorübergehende ist, und daß sehr bald selbst von den Hauptablagerungsstätten des Silbers dieses wieder zur Ausscheidung gebracht wird“. Aehnlich lauteten die Resultate der Klimmer'schen Arbeit. Soviel über die Aufnahme des kolloïdalen Silbers in den Organismus, seinen Verbleib in demselben und seine Ausscheidung.

Bevor ich nun auf die experimentellen Erfahrungen über den Einfluß des Mittels auf Infektion zu sprechen komme, empfiehlt es sich, die bisher gewonnenen Resultate über seine antibakteriellen Eigenschaften mitzuteilen. Da dieselben vornehmlich an seinen Lösungen in destilliertem Wasser geprüft wurden, so will ich zunächst die wesentlichsten über die Natur dieser wässerigen Collargollösungen gefundenen Thatsachen mitteilen. Das Heyden'sche kolloïdale Silber ist nur zum Teil in destilliertem Wasser löslich[3]), ein beträchtlicher Teil des Metalls schlägt sich in unlöslicher Form nieder. Die Lösungen sind unbeständig; Licht und Wärme beeinflussen die Konzentration derselben in hohem Grade, desgleichen längeres Stehenlassen. So fand Brunner[4]), daß Lösungen von 1 : 50 nach einigen Tagen nur noch Silber im Verhältnis von 1 : 186 enthielten, das übrige Silber hatte sich am Boden des Gefäßes in unlöslicher Form als schwarzes, feinkörniges Pulver niedergeschlagen. Eine gleich auf ihren Silbergehalt geprüfte filtrierte Lösung von 1 : 50 ergab einen solchen im Verhältnis von 1 : 180, eine Lösung von 1 : 100, in derselben Weise geprüft, einen solchen im Verhältnis von 1 : 300, u. s. w.

Die Ergebnisse der Untersuchungen dieser Lösungen in Bezug auf

---

1) Klimmer, Einige Mitteilungen über kolloïdales Silber. (Zeitschr. f. Tiermed. Bd. IV. 1900.)

2) Lange, Ueber eine Methode zum Nachweis minimaler Mengen von Silber in organischen Geweben. (Therap. Monatshefte. 1900. Aug.) — Ueber die Verteilung des Silbers im Organismus nach endovenöser Einführung in kolloïdaler Form. (Ibid. 1900. Oktober.)

3) Brunner, Ueber das lösliche Silber und seinen therapeutischen Wert. (Fortschritte d. Med. 1900. No. 20.)

4) Brunner, l. c.

ihre antibakteriellen Eigenschaften sind außerordentlich widersprechend. Während Schlossmann[1]) fand, daß die Collargollösung an Wirksamkeit noch diejenige des Sublimats übertraf, und zwar besonders bei Verwendung der pyogenen Kokken, der Diphtheriebacillen und der zur Coli-Gruppe gehörigen Individuen, und andererseits Baldoni[2]) feststellte, daß die 1-proz. Lösung des Collargols Staphylococccus albus nach 20, aureus nach 30 und Streptococcus nach 32 Minuten tötete, fand Brunner[3]) in seinen exakten Untersuchungen, daß eine Collargollösung, welche Silber im Verhältnis von 1 : 96,9 enthielt, also ungefähr einer frisch bereiteten Lösung von 1 : 30 entsprechen dürfte, Staphylococcus aureus erst nach 12 Stunden tötete. Aehnliche Resultate scheint auch Beyer[4]) erhalten zu haben.

Um so ausgesprochener zeigten sich dagegen die entwickelungshemmenden Eigenschaften: Lösungen bis 1 : 6000 vermögen auf Staphylococcus hemmend einzuwirken, wie Brunner feststellen konnte.

Die Untersuchungen über den Einfluß des Argentum colloïdale auf Infektion führten bei Brunner[5]) zu vollkommen negativen Resultaten. Er infizierte Kaninchen mit hochvirulentem Staphylococcus aureus, nachdem er ihnen zuvor bis zu 0,1 Collargol intravenös eingespritzt hatte. Die Kontrolltiere starben meist später als die mit dem Silber behandelten; in keinem Falle hatte das kolloïdale Silber die Bakterien im Organismus vernichtet. Ganz andere Resultate erhielt Beyer[6]), der allerdings nur über 2 Kaninchenversuche mit Staphylokokken berichtet. Er injizierte einem gesunden Kaninchen 10 ccm einer „sehr virulenten“ Staphylokokkenkultur intravenös. Als es „Zeichen heftiger Erkrankung“ darbot, spritzte er ihm 0,4 Argentum colloïdale in 1-proz. Lösung intravenös ein. Das Tier genas. Der zweite Tierversuch hatte dieselbe Versuchsanordnung, nur wurde das Collargol nicht intravenös, sondern subkutan gegeben. Auch dieses Tier kam durch, allerdings erst nach längerer Krankheitsdauer. In dem Referate über Beyer's Vortrag fehlt aber die Begründung der Bezeichnung „sehr virulent“; jedenfalls findet sich nirgends eine Andeutung davon, daß er, wie Brunner, die Virulenz seiner Staphylokokken durch Parallelversuche an Kontrolltieren festgestellt hat. Selbstverständlich würden diese Versuche nur unter dieser Voraussetzung Beweiskraft haben.

Versuche mit anderen Infektionsträgern hat Beyer nicht angestellt, sondern sich vielmehr auf die nach dieser Richtung hin in der Veterinärmedizin gemachten Erfahrungen verlassen, welch letztere er als „Tierexperimente im Großen“ bezeichnet. Meinen obigen Erörterungen über die Beweiskraft derselben habe ich an dieser Stelle nichts weiter hinzuzufügen.

Während also Brunner auf Grund der negativen Ergebnisse seiner Untersuchungen sich dahin äußert, daß das Argentum colloïdale selbst in großen Dosen keinen Einfluß auf allgemeine Eiterinfektionen hat, ja sogar den Tod infizierter Tiere zuweilen beschleunigte, glaubt Beyer auf Grund der mitgeteilten Versuche und der klinischen Er-

---

1) Schlossmann, Ueber die therapeutische Verwendung kolloïdaler Metalle. (Therap. Monatshefte. 1899. Mai.)

2) Baldoni, La clinica veterinaria. Mailand 1899. Okt.

3) Brunner, l. c.

4) Beyer, l. c.

5) Brunner, l. c.

6) Beyer, l. c.

fahrungen am Menschen und in der Veterinärmedizin, daß „das Argentum colloïdale einen Einfluß auf den Verlauf infektiöser Erkrankungen besitzt“ und stellt sich die Wirkungsweise desselben bei Infektion in der Weise vor, daß „das Silber in den Blutstrom aufgenommen, die Körperflüssigkeiten in antibakterielle Lösungen verwandele, die direkt oder indirekt auf Spaltpilze einwirken“.

Trotz genauester Durchsicht der mir zugänglichen Litteratur konnte ich nur feststellen, daß weitere experimentelle Untersuchungen über den Einfluß des löslichen Silbers auf Infektion nicht angestellt worden sind [1]). Es ist dies um so bedauerlicher, als der auffallende Widerspruch in den Resultaten der beiden letztgenannten Autoren eine experimentelle Bestätigung der klinischen Erfolge resp. Mißerfolge mit dem Argentum colloïdale nicht geben läßt, obschon man eigentlich die Brunner'schen Resultate aus den oben angeführten Gründen für einwandsfreiere Beobachtungen halten muß als die von Beyer gefundenen.

Und doch war es offenbar von außerordentlicher Wichtigkeit und großem Werte für die Praxis, auf experimentellem Wege die Lösung der Frage zu versuchen, ob das Mittel thatsächlich das zu leisten vermag, was die Kliniker ihm zugeschrieben haben. Denn theoretisch lag meines Erachtens bis jetzt nichts von Belang vor, auf Grund dessen dem Argentum colloïdale eine baktericide Wirkung a priori hätte zugeschrieben werden können. Die bekannten Arbeiten von Paul und Krönig haben ja über die Natur der Wirksamkeit von antiseptischen Lösungen in letzter Zeit außerordentlich aufklärende Thatsachen beigebracht. Wir wissen aus den Arbeiten von van t' Hoff und Arrhenius, daß Salze in gelöstem Zustande, z. B. in wässerigen Lösungen, zum Teil dissociiert sind, daß z. B. infolge der dissociierenden Kraft des Wassers in einer wässerigen Sublimatlösung neben $HgCl_2$-Molekülen Teilmoleküle dieser Verbindungen, als Hg- und Cl_2-Ionen, vorkommen. Die Versuche der beiden oben genannten Autoren gestatten nun den Schluß, daß die desinfizierende Wirkung der von ihnen untersuchten wässerigen Hg-, Ag-, Au-, Cu-Salze um so stärker ist, je stärker diese Metallsalzverbindungen dissociiert sind, d. h. je mehr Metallionen in der Volumeneinheit der betreffenden Lösung vorhanden sind. Betrachten wir nun nach diesen Gesichtspunkten hin die kolloïdale Silberlösung, so dürfen wir von vornherein nicht erwarten, daß die in ihr enthaltenen, nicht ionisierten Ag-Moleküle eine ausgesprochene baktericide Wirksamkeit entfalten werden.

Eigene Versuche.

Um mir zunächst von der von Credé supponierten bakterientötenden Kraft des löslichen Silbers [2]) ein klares Bild zu verschaffen, begann ich meine Untersuchungen über den Einfluß des Collargols auf

1) Etwa einen Monat nach der Veröffentlichung meiner ersten Arbeit über experimentelle Erfahrungen mit dem Collargol (Dissertation 1902) finde ich in No. 31 der Münch. med. Wochenschr. d. J. eine Arbeit von Dr. R. Trommsdorff: „Zur Frage der Wirksamkeit des Collargol.“ Genannter Autor infizierte Kaninchen mit Schweinerotlauf und Schweineseuche. Die Collargolbehandlung erfolgte zuerst mit Dosen von 2—3 ccm einer 1-promill. Lösung intravenös, später mit der gleichen Menge einer 1-proz. Lösung, also der 10-fachen Menge als zuvor. In allen Fällen war das Resultat vollkommen negativ, sämtliche Versuchstiere gingen ein.

2) In liebenswürdigster Weise wurde mir von der chemischen Fabrik von Heyden eine Quantität Collargol zur Verfügung gestellt, wofür ich an dieser Stelle meinen besten Dank abstatte.

Infektion mit einer Prüfung seiner antibakteriellen Eigenschaften im Reagensglase. Hierzu war es aber zunächst erforderlich, das Verhalten der Lösungen, mit denen ich experimentierte, gegenüber den Nährsubstraten festzustellen, um etwaige Fehlerquellen zu vermeiden. Eine Reihe hier nicht zu schildernder Versuche ergab in dieser Beziehung eine vollkommene Uebereinstimmung mit den von Brunner[1]) angegebenen Resultaten, daß nämlich durch Nährbouillon, Bouillongelatine und Bouillonagar das Silber aus den Lösungen in destilliertem Wasser fast vollständig in unlöslicher Form gefällt wird.

Ich experimentierte zunächst mit wässerigen Lösungen von Argentum colloïdale. Dieselben wurden in der Weise hergestellt, daß das betreffende Quantum des löslichen Silbers in Substanz im braunen Fläschchen in bestimmte Mengen sterilisierten destillierten Wassers gethan wurde. Ich wartete nun, bis die Stücke weich geworden, zerdrückte sie alsdann mit einem sterilisierten Glasstabe und schüttelte, bis die Lösung annähernd vollkommen vollzogen war. Beiläufig bemerkt, löste sich das Metall nie vollkommen auf, auch nicht in dem von der Fabrik hierfür angegebenen Löslichkeitsverhältnis von 1:25, vielmehr setzte sich stets schon nach kurzer Zeit ein Niederschlag am Boden des Fläschchens ab. Die Lösungen wurden für die Experimente stets frisch hergestellt, da ihre Konzentration schon allein durch längeres Aufbewahren selbst unter günstigsten Bedingungen (kühler, dunkler Ort) nach den Brunner'schen Untersuchungen ungünstig beeinflußt wurde. Nachdem sich der Niederschlag abgesetzt hatte, goß ich vorsichtig die Lösung ab, wobei derselbe im Fläschchen zurückblieb, und prüfte sie in ihrem antibakteriellen Verhalten gegen Staphylococcus aureus, Streptococcus, Diphtherie und Bacillus anthracis, und zwar gegen letzteren in vollkommen sporenfreiem Zustande.

Die von mir benutzten Kulturen waren sämtlich hochvirulent; die Staphylokokken hatte ich mir frisch aus einem Panaritium, die Streptokokken aus einem Absceß beim Menschen gezüchtet; desgleichen die Diphtherie aus einer dem Institut zur Untersuchung eingesandten Diphtherieprobe. Bacillus anthracis schickte ich, um ihn hochvirulent und gleichzeitig sporenfrei zu bekommen, durch eine Maus, deren Milz ich dann in feinste Partikelchen zerrieb und in Bouillon aufschwemmte.

Um die Gewißheit zu haben, stets genau die gleiche Menge Impfmaterial den Lösungen einzuverleiben, verfuhr ich in der Weise, daß ich mir von sämtlichen der genannten Bakterien feinste Aufschwemmungen in Bouillon herstellte und genau $^1/_{20}$ ccm derselben in Reagensgläschen hineinbrachte, deren jedes genau die gleiche Menge einer bestimmten Silberlösung enthielt. So befanden sich beispielsweise in einem Gläschen 5 ccm einer Lösung 1:50, in einem zweiten 5 ccm einer solchen von 1:80, in einem dritten 5 ccm von 1:100 u. s. f. Es sei übrigens an dieser Stelle ausdrücklich hervorgehoben, daß ich die Löslichkeitsverhältnisse, wie sie von Brunner näher untersucht worden und von mir bereits oben angeführt sind, vollkommen bei meinen Versuchen ignorierte, da ich solche Verhältnisse schaffen und untersuchen sollte, wie sie sich eben in der Praxis gestalten. Es ist daher im Folgenden zu berücksichtigen, daß, wenn ich beispielsweise von Lösungen 1:50, 1:100 u. s. w. spreche, diese in Wirklichkeit Silber nur im Verhältnis von 1:180, 1:285 u. s. w. (Brunner) enthalten. Nachdem

1) Brunner, l. c.

diese bestimmten Quanta der Silberlösungen auf die beschriebene Art mit Impfmaterial beschickt waren, das, beiläufig gesagt, stets aus 16—24-stündigen Kulturen auf Agar stammte, brachte ich sie an einen dunklen Ort, der eine konstante Temperatur (etwa Zimmertemperatur) hatte, und zwar benutzte ich für diese Zwecke einen dauernd auf 22° C eingestellten Thermostaten. Aus dieseu Lösungen entnahm ich nun in bestimmten Zeitintervallen (alle Stunde) genau $^1/_{10}$ ccm und impfte

1) mit denselben Bouillonröhrchen, die genau 10 ccm Bouillon enthielten;
2) mit weiteren $^1/_{10}$ ccm flüssig gemachten Agar, von dem ich dann Platten goß.

Und zwar wählte ich Agar statt Gelatine, weil das Temperaturoptimum der von mir hauptächlich verwandten Bakterien, des Bacillus anthracis und des Staphylococcus aureus, bei ca. 37° C liegt, also über der Verflüssigungstemperatur der Gelatine.

Da ich aus den oben beschriebenen Versuchen wußte, daß das kolloïdale Silber in Nährbouillon sofort niedergeschlagen wird, so konnte füglich von einer Fortsetzung seiner desinfizierenden Wirkung auf die zugleich verimpften Bakterien nicht die Rede sein.

Auf diese Weise konnte ich einmal mittels des Plattengießens verfolgen, mit welcher Intensität die Abtötung erfolgte, was aus der Zahl der auf der Platte sich entwickelnden Keime geschlossen werden kann, und zweitens mittels der Bouillonröhrchen genau feststellen, zu welcher Zeit sämtliche Keime abgetötet, also die vollkommene Desinfektionswirkung eingetreten war. Es gab dieses viel genauere Resultate als das einfache Plattengießen, da bekanntlich ein einziger Keim genügt, um die Bouillon zu trüben, während er auf der Agarplatte übersehen werden kann. Diese Erfahrung konnte ich vielfach bei meinen Versuchen machen.

Die Zählung der auf den Platten gewachsenen Kolonieen erfolgte zum ersten Male nach 24-stündigem Aufenthalte im Thermostaten von 37°, eine zweite Zählung schloß ich am 3., eine dritte endlich am 4. Tage an.

Ebenso wie die Agarplatten brachte ich natürlich auch die geimpften Bouillonröhrchen in den 37° Brütschrank und beobachtete sie 10 Tage lang auf Bakterienentwickelung.

Solche Versuche wiederholte ich des öfteren in genau der gleichen, soeben ausführlich geschilderten Versuchsanordnung und fand auf diese Weise, daß eine Lösung von Collargol in destilliertem Wasser im Verhältnisse von 1 : 30 — also mit einem Silbergehalte nach Brunner von etwa 1 : 100 — Staphylococcus aureus nach 10 Stunden vollkommen abtötet.

Von derselben Lösung wurden Streptokokken bereits nach 8 Stunden, Diphtheriebacillen schon nach 6 Stunden vernichtet. Den sporenfreien Milzbrand tötete die genannte Lösung bereits nach 4 Stunden vollständig ab. Schwächere Konzentrationen als 1 : 30 vermochten Staphylococcus aureus, nach 12 Stunden sogar, nicht mehr abzutöten, so daß also die letztgenannte Lösung als oberster Grenzwert für Staphylokokken bezeichnet werden muß.

In analoger Weise ergab sich als obere Grenze für Streptokokken und Diphtheriebacillen die Lösung von 1 : 50 (Silbergehalt nach Brunner 1 : 180), welche beide Bakterienarten nach etwa 10 Stunden vernichtete. Für sporenfreien Milzbrand ermittelte ich die obere Grenzschwelle bei

Lösung von 1:100 (Silbergehalt nach Brunner 1:300) nach etwa 8 Stunden.

Soviel über die baktericide Kraft der wässerigen Collargollösungen. Es kam mir nun darauf an, zu ermitteln, wie sich das lösliche Silber im Blutserum verhielt. Zu diesem Zwecke mußte zunächst erst erprobt werden, ob sich das Collargol überhaupt darin löste und, falls ja, ob diese Lösungen ebenso unbeständig wären, wie die wässerigen. Die Versuche, welche ich hierüber anstellte, bestätigten im wesentlichen die von Brunner[1]) mitgeteilten Resultate, „daß nämlich das kolloïdale Silber weder in reinem Blutserum noch in dessen wässerigen (5- und 10-proz.) Lösungen unmittelbar löslich ist. Will man eine Lösung erhalten, so muß Blutserum mit einer wässerigen Lösung von Argentum colloïdale gemischt werden; aus einer solchen wässerig-serösen Lösung wird das Silber von Bouillon- oder Gelatinezusatz nicht mehr gefällt“.

Es war nun interessant, einmal zu prüfen, ob das lösliche Silber durch das Blutserum in seiner bakterientötenden Kraft ebenso beeinträchtigt würde wie das Sublimat. Andererseits aber bestand auch die Möglichkeit, daß es vielleicht mit den komplizierten chemischen Bestandteilen des Serums antiseptische Verbindungen zu bilden imstande war, deren Baktericidie ungleich höher lag, als die eben ermittelte.

Ich stellte mir nun die wässerig-serösen Lösungen des Collargols in der Weise her, daß ich zunächst eine wässerige Stammlösung in der oben ausführlich geschilderten Weise bereitete. Diese mischte ich nun mit sterilem Rinderserum dergestalt, daß ich steigende Konzentrationen bei stets gleichem Quantum in den einzelnen Reagensgläschen erhielt; die so erhaltenen Lösungen impfte und behandelte ich in genau derselben Weise und mit denselben Infektionserregern, wie ich es gelegentlich der Prüfung der antibakteriellen Eigenschaften wässeriger Collargollösungen ausführlich beschrieben habe. Bemerkt sei noch, daß ich das Rinderserum, um die störende Wirkung der Komplemente auszuschalten, 3 Stunden lang auf eine Temperatur von 58° C erwärmte. Dabei zeigte sich jedoch, daß diese Prozedur die Agglutinine unbeeinflußt ließ, wie ich das mittels Typhusbacillen nachzuweisen vermochte. Doch konnte ich unter Berücksichtigung dieser Fehlerquelle einwandfreie Resultate erhalten.

Es ergab sich nun, daß zwischen der bakterientötenden Kraft der wässerigen und der wässerig-serösen Collargollösung kein nennenswerter Unterschied bestand und die oben ermittelten Grenzwerte auch für diesen Fall zutrafen. Ebensowenig machte sich ein Unterschied in der Wirkung bemerkbar, wenn ich die geimpften wässerig-serösen Collargollösungen statt zuerst in den 22° Thermostaten direkt in den 37° Brütschrank stellte. Ein ungünstiger Einfluß des Blutserums auf das kolloïdale Silber, wie etwa beim Sublimat, ist also nicht vorhanden; andererseits ist aber auch von einer Steigerung der Baktericidie nicht die Rede.

Abgesehen von den bakterientötenden, suchte ich auch die entwickelungshemmenden Eigenschaften des löslichen Silbers zu ermitteln und verfuhr zu diesem Zwecke nach der von Brunner[2]) angegebenen Methode: „Es wurden in sterile Reagensgläschen steigende Mengen einer bestimmten Lösung von Silber in 5-proz. Blutserum gegossen; darauf

1) Brunner, l. c.
2) Brunner, l. c.

wurde in dieselben Gläser sterile Fleischpeptonbouillon gebracht, so daß das Quantum Flüssigkeit in jedem Gläschen 5 ccm betrug. Auf so zubereitete Lösungen wurde mittels Platinöse virulenter Staphylococcus aureus geimpft und alle Gläser in einen Thermostaten von 37° C gebracht." Ich fand als Grenzwert für Staphylococcus aureus eine Lösung von 1 : 5000 bei 10-tägiger Beobachtung der Gläschen.

Kurz zusammengefaßt zeigen also die Ergebnisse meiner Reagensglasversuche eine fast völlige Uebereinstimmung in Hinsicht auf die antibakteriellen Grenzwerte mit den Brunner'schen.

Es besitzt somit das Argentum colloïdale neben ausgesprochenen entwickelungshemmenden Eigenschaften eine außerordentlich geringe Baktericidie. Selbstverständlich bin ich weit davon entfernt, diese Laboratoriumsversuche im Reagensglase auf den Tierkörper übertragen zu wollen. Vielmehr hatten dieselben nur den Zweck, mir ein ungefähres Bild davon zu liefern, was in antiseptischer Beziehung überhaupt von dem Collargol zu erwarten war.

Um die Wirkungen desselben auf den tierischen Organismus zu prüfen, stellte ich folgende Versuche an. Es galt zunächst festzustellen, ob das Argentum colloïdale überhaupt toxisch wirkt und man imstande ist, experimentell Vergiftungen damit hervorzurufen. Zu diesem Zwecke injizierte ich zunächst einem männlichen Kaninchen von 2020 g Gewicht eine Dosis von 0,1 Collargol in die Randvene eines Ohres und zwar löste ich die genannte Menge Silber in 5 ccm Flüssigkeit, davon 3 ccm destillierten Wassers, 2 ccm Blutserum des betreffenden Tieres, um nicht allzuviel destilliertes Wasser ins Blut zu bringen, was eventuell nachteilige Folgen hätte entwickeln und die Versuchsresultate hätte trüben können. Der Injektion folgten keinerlei Krankheitserscheinungen oder Störungen im Allgemeinbefinden, trotzdem ich das Tier eine Woche lang genau beobachtete (Versuch I).

Versuch II. Ich injizierte nun einem anderen Tiere, männliches Kaninchen von 2130 g Gewicht, 0,6 lösliches Silber in 5 ccm Flüssigkeit, die, wie beim vorigen Versuche, aus 3 Teilen Aq. dest. und 2 Teilen Blutserum dieses Kaninchens bestand.

Wie bei dem vorigen, so erfolgte auch bei diesem Tiere die Injektion intravenös. Auch diese für ein so kleines Tier gewiß außerordentlich große Gabe wurde ohne die geringsten Krankheitserscheinungen vertragen, und solche blieben auch aus, als ich nach 2 Tagen demselben Tiere weitere 0,5 g löslichen Silbers in 5 ccm destillierten Wassers intravenös injizierte.

Versuch III. Einem dritten Kaninchen endlich, das ein Gewicht von 2110 g besaß, injizierte ich 0,1 Collargol in 10 ccm Flüssigkeit (8 ccm destillierten Wassers und 2 ccm Serum desselben Tieres) in die Jugularis. Auch dieses Tier blieb ohne Störungen des Allgemeinbefindens am Leben. Wenn selbst solche, im Verhältnis zum Körpergewicht des Tieres ganz gewaltig große Dosen nicht die geringsten Krankheitserscheinungen auslösen, so beweist das mit absoluter Sicherheit, daß das Argentum colloïdale toxische Einflüsse auf den Organismus nicht besitzt. Es war dieses Verhalten um so merkwürdiger, als doch bekanntlich das metallische Silber selbst, ebenso wie seine gewöhnlichen Salze, z. B. das Arg. nitricum, ein außerordentlich schweres Gift für den Körper darstellen, das schon in minimalen Dosen bald nach der Einverleibung denselben zu vernichten vermag.

Um über den Verbleib des löslichen Silbers nach seiner Einführung in den Organismus Aufklärung zu erhalten, ging ich in folgender Weise vor.

Versuch IV. Ich injizierte einem 2120 g wiegenden männlichen Kaninchen 1,0 Argentum colloïdale in Lösung in die Randvene eines Ohres und tötete das Tier nach einer Stunde durch Verbluten. Bei der sofort vorgenommenen Sektion ergab sich folgendes.

Von den Brustorganen war am Herzen nichts Abnormes zu finden, dagegen fanden sich an den Lungen grauschwarz verfärbte Partieen in Gestalt von größeren und kleineren Flecken und Pünktchen. Stellenweise waren die Lungen atelektatisch.

Bei der Eröffnung der Bauchhöhle zeigte sich eine starke Gasauftreibung der Därme, welche übrigens nicht die Spur einer schwärzlichen Verfärbung zeigten. Die Darmgefäße waren strotzend mit Blut gefüllt.

Die Milz war deutlich vergrößert, dunkelgrünschwarz verfärbt, fühlte sich sehr hart an und zeigte auf der Schnittfläche deutliche Follikelzeichnung.

Die Leber hatte dunkelschwarze Farbe mit einem Stich ins Dunkelgrüne, schien etwas vergrößert zu sein und hatte harte, brüchige Konsistenz. Auf der Schnittfläche erkannte man sehr deutlich die acinöse Zeichnung.

Die Nieren hatten die normale, braunrote Farbe und zeigten auf dem Durchschnitte in der Rindenschicht eine ganz leichte, grauschwärzliche Verfärbung.

Die retroperitonealen Lymphdrüsen waren deutlich geschwollen und ebenfalls grauschwärzlich verfärbt.

Es war also das Silber augenscheinlich schon innerhalb einer Stunde in den meisten Organen niedergeschlagen. Um nähere Einzelheiten über den Sitz der Niederschläge zu ermitteln, härtete ich die Organe und untersuchte sie mikroskopisch in Celloïdin- und Paraffinschnitten. Die dabei erhobenen Befunde waren folgende:

In der Niere finden sich vereinzelte schwarze Körnchen, die vor allem in den Glomerulis sitzen; ein Teil derselben befindet sich auch in den Epithelien der geraden Harnkanälchen. Zur Identifizierung des Niederschlages mit Silber wird eine 1-proz. Lösung von Cyankali zugesetzt, worauf die körnigen Niederschläge in ungefähr einer halben Stunde verschwanden.

Lunge: Bei der Beobachtung des ungefärbten Präparates sieht man eine Anzahl von größeren Schollen schwarzer Farbe, welche sich in dem interalveolären Bindegewebe, und zwar hauptsächlich um die Gefäße herum gruppiert, befinden. Ferner sieht man eine Anzahl mehr braun gefärbter kleiner Körnchen, die ebenfalls in dem interalveolären Bindegewebe gelegen sind. Diese letzteren verschwanden auf Zusatz einer 1-proz. Lösung von Cyankali innerhalb von 1—2 Stunden. Es blieben aber die großen, schwarzen Schollen bestehen und dürften mithin als Kohlepigment anzusprechen sein; dagegen sind die auf Cyankalizusatz verschwundenen Körper ganz zweifellos als imprägniertes Silber anzusehen.

In der Milz sieht man eine nicht unbeträchtliche Anzahl von dunkelbraunen Körnchen, welche diffus in der Milzpulpa verteilt sind. Auch in dem Lumen einiger größeren Gefäße fanden sich dieselben vor; auf Cyankalizusatz verschwanden sie prompt.

Die Leber bietet den interessantesten Befund dar. Hier sieht man nämlich zwischen den Leberzellen schön sternförmig verästelte Zellen, die vollkommen mit schwarzen Pigmentkörnchen erfüllt sind. Es handelte sich hier offenbar um die seiner Zeit von v. Kupffer entdeckten Sternzellen der Leber, denn alles in der v. Kupffer'schen Arbeit [1]) darüber Mitgeteilte in histologischer Beziehung traf auf diese mit dem Collargol imprägnierten Gebilde genau zu. Diese von mir gefundene Art der vitalen Darstellung der v. Kupffer'schen Sternzellen zeichnet sich unter den bisher üblichen, von v. Kupffer in der citierten Arbeit ausführlich beschriebenen Methoden vorteilhaft durch ihre Einfachheit und Distinktheit aus [2]). Das Pigment verschwindet prompt im Verlaufe einer halben Stunde nach Zusatz einer $^1/_2$-proz. Cyankalilösung.

In den Lymphdrüsen findet sich eine sehr große Anzahl von Körnchen, in den Lymphsinus, rings um die Follikel herum und zwischen den Marksträngen. Herrn Privatdocent Dr. M. Askanazy, I. Assistenten des hiesigen pathologischen Universitätsinstitutes, sage ich an dieser Stelle für die liebenswürdige Unterstützung bei Aufnahme des mikroskopischen Befundes meinen verbindlichsten Dank.

Eine Wiederholung des oben ausführlich beschriebenen Versuches an einem weiteren Tiere führte zu gleichen Resultaten, so daß ich seine Beschreibung, um Wiederholungen zu vermeiden, unterlasse.

Versuch V. Ich injizierte nun einem 1200 g wiegenden, weiblichen Kaninchen 1,0 Argentum colloïdale, in 10 ccm destillierten Wassers gelöst, in die Randvene eines Ohres und tötete das Tier 3 Minuten später. Die sofort vorgenommene Sektion hatte folgende Ergebnisse:

Die Milz ist wenig vergrößert, zeigt annähernd ihren normalen, rotbläulichen Farbenton mit einem Stich ins Grauschwarze. Konsistenz prall, etwas fest; auf der Schnittfläche deutliche Follikelzeichnung.

Die Leber ist dunkelschwarz verfärbt, ins Schwarzgrünliche hinüberspielend; Konsistenz brüchig, auf der Schnittfläche acinöse Zeichnung.

Nieren, von braunrötlicher Farbe, zeigen auf dem Durchschnitte keine Spur von Verfärbung. Letzteres gilt auch von dem gesamten Darmtraktus.

Die Lungen zeigten wieder stellenweise grauschwärzliche Verfärbung in Form von feineren und gröberen Fleckchen und Pünktchen.

Auch von diesem Tiere härtete ich die Organe und legte Celloïdin- und Paraffinschnitte an, die genau dieselben Bilder lieferten, wie sie im Versuche IV ausführlich beschrieben sind, auf den ich daher verweise. Hervorgehoben sei nur, daß die v. Kupffer'schen Zellen auch nach dieser kurzen Zeit schon die schöne, oben beschriebene, isolierte Färbung zeigten.

Ich beschränkte mich auf den mikroskopischen Nachweis des Silbers in den einzelnen Organen und habe den qualitativ chemischen des Silbergehaltes derselben nicht ausgeführt. In dieser Beziehung verweise ich auf die bereits oben mitgeteilten Lange'schen Resultate.

Dagegen schien es mir von ganz besonderer Wichtigkeit zu sein, das Blut auf seinen Gehalt an Silber zu untersuchen. Denn die Be-

---

1) Ueber die sogenannten Sternzellen der Säugetiere. (Arch. f. mikrosk. Anat. Bd. LIV.)

2) Herr Geheimrat v. Kupffer hat auf meine Mitteilung hin die von mir erhobenen Befunde in einem freundlichen Schreiben anerkannt.

hauptung Beyer's[1]), das kolloïdale Silber ließe sich nach 8—10 Stunden nach der Einführung im Blute nachweisen, und ferner seine Schlußfolgerung, „das Silber wird in den Blutstrom aufgenommen, verwandelt die Körperflüssigkeiten in antibakterielle Lösungen ...", war offenbar für die Erklärung therapeutischer Erfolge von weitgehendster Bedeutung, da bei einem derartigen Verhalten des Collargols einmal den im Blute kreisenden Mikroorganismen rasch der Garaus gemacht werden und andererseits auch die in den Organen befindlichen Bakterien durch das von dem Blute immer von neuem zugeführte Silber schließlich abgetötet werden mußten.

Wie ich gleich bemerken will, habe ich zu den Untersuchungen des Blutes auf Silbergehalt, die ich im hiesigen pharmakologischen Universitätsinstitute unter gütiger Aufsicht des Herrn Privatdocenten Dr. Ellinger, Assistenten am Institute, ausführte, dem ich an dieser Stelle meinen herzlichsten Dank für die liebenswürdige Unterweisung und Unterstützung bei den Arbeiten ausspreche, nicht die Kunz-Krausesche Methode benutzt. In groben Zügen mitgeteilt, besteht letztere in Zerstörung der organischen Substanz durch Salzsäure und Kaliumchlorat, Abdampfen, Filtrierung des in Wasser gelösten Verdampfungsrückstandes, Versetzung des Filtrates mit NaCl, Prüfung des entstandenen Chlorsilbers unter Verwendung einer Sammellinse, welche den Zweck hat, den minimalen, schwer sichtbaren Chlorsilberniederschlag durch den infolge der konzentrierteren Lichteinwirkung schärfer hervortretenden Farbenwechsel (Schwärzung) deutlicher zu machen.

Diese Methode leidet nach Klimmer[2]) an nicht unerheblichen Mängeln. „Während bei einer zweckentsprechenden Verbrennung der mit Salpetersäure vorbehandelten organischen Substanz Verluste an Silber ausgeschlossen sind, kann dagegen ein nicht unerheblicher Bruchteil des Silbers verloren gehen, wenn man den von Herrn Kunz-Krause eingeschlagenen Weg begeht, zumal wenn man, wie Herr Kunz-Krause, unterläßt, das in Salzsäure und Chloriden relativ leicht lösliche Chlorsilber in das schwerer lösliche Jodsilber überzuführen. Das infolge der Gegenwart von Chloriden gelöste Chlorsilber wird beim Abfiltrieren hindurchlaufen und für die weitere Untersuchung verloren gehen."

Ich ging nun in der Weise vor, daß ich die Gesamtblutmenge (etwa 40 ccm) eines 45 Minuten nach der Injektion von 1,0 Collargol in Lösung in die Jugularis durch Verbluten getöteten Kaninchens von 1020 g Gewicht zunächst mit einem Gemisch von Salpeter und Soda — im Verhältnis von 1 : 3 — im Platintiegel veraschte. Die Veraschung wurde unter fortgesetztem Zusatze kleiner Mengen Salpeter so weit getrieben, bis alle Kohle verschwunden war. Die Asche wurde jetzt in heißem Wasser gelöst, bis nicht der geringste Rückstand mehr im Platintiegel verblieb, die Lösung wurde mehrmals durch dasselbe Filter geschickt, bis das Filtrat vollkommen klar war. Hierauf wurde das Filter mit heißem Wasser solange ausgewaschen, bis keine Chlorreaktion mehr auftrat. Nachdem das erreicht war, wusch ich das Filter mit einer heißen Lösung von Salpetersäure in destilliertem Wasser wiederholt aus und prüfte die Waschflüssigkeit mit Salzsäure auf Silber.

---

1) Beyer, l. c.
2) Münch. med. Wochenschr. 1902. No. 8.

Damit mir nichts von Silber verloren gehen konnte, kochte ich schließlich das ganze Filter im Kölbchen mit Salpetersäure-Wasserlösung, filtrierte die gekochte Flüssigkeit, bis sie vollkommen klar war und untersuchte dann das Filtrat auf Silber.

Das Resultat war vollkommen negativ, auch nicht die geringste Spur Silber fand sich im Blute schon 45 Minuten nach der Injektion.

Der Versuch wurde in genau gleicher Anordnung noch einmal wiederholt, wieder mit negativem Resultate, und außerdem zur Kontrolle, ob sich kolloïdales Silber überhaupt mittels dieser Methode nachweisen ließe, folgender Versuch angestellt.

Es wurden 3,5 mg Collargol in ungefähr 40 ccm Blut gelöst und die Blutmenge nach der eben geschilderten Methode auf Silber geprüft. Das Resultat war vollkommen positiv, der Chlorsilberniederschlag auch ohne Anwendung der Kunz-Krause'schen Sammellinse sehr deutlich.

Wenn sich somit eine so winzige Menge Silbers, wie 3,5 mg, nicht dem Nachweise entzieht, sondern eine so deutliche Reaktion giebt, so folgt daraus, daß zum mindesten viel weniger als 3,5 mg, wahrscheinlich aber gar kein Silber mehr nach 45 Minuten im Blute vorhanden ist.

Es kann folglich gar nicht die Rede davon sein, daß die Körperflüssigkeiten in „antibakterielle Lösungen“ umgewandelt werden, und kann daher eine etwaige Wirksamkeit des Collargols bei Infektion auf diese Weise nicht erklärt werden.

Fasse ich nunmehr die Resultate meiner bisher beschriebenen Versuche kurz zusammen, so hat sich folgendes ergeben:

Das lösliche Silber wird fast unmittelbar nach der Einführung in die Blutbahn aus derselben ausgeschieden und ist bereits 45 Minuten nach der intravenösen Injektion im Gesamtblute nicht mehr nachzuweisen. Dagegen findet es sich schon 3 Minuten nach der Einführung in fast sämtlichen Organen niedergeschlagen, und zwar am reichlichsten in Leber und Lunge, nicht so reichlich in Milz, Nieren, Lymphdrüsen und Knochenmark. Diese Niederschläge sind für den Organismus vollkommen indifferent und entfalten keinerlei toxische Wirkungen.

Es fragte sich nun, ob vielleicht diese Silberdepots mit den Stoffwechselprodukten der im Körper kreisenden Bakterien baktericide Verbindungen einzugehen vermochten, die dann ihrerseits die Mikroorganismen vernichteten. Denn daß eine direkte Abtötung der Infektionserreger durch das niedergeschlagene Silber selbst erfolgen sollte, war schon deshalb ausgeschlossen, weil alsdann schon lange vor Vernichtung der Bakterien die viel zarteren Körperzellen selber hätten zerstört werden müssen; von solchen toxischen Wirkungen war aber nach den bisherigen Versuchen nicht die Rede.

Nun, die Frage, ob das niedergeschlagene Silber gegen im Körper kreisende Infektionserreger die gedachten Eigenschaften zu entfalten vermöchte, oder ob es vielmehr nichts weiter war, als ein unwirksamer, für Mikroorganismen völlig irrelevanter Niederschlag, der dem Körper eher lästig als nützlich war, konnte leicht an Tierversuchen entschieden werden.

Da das Mittel als ein Specificum gegen septische und pyämische Erkrankungen in erster Linie empfohlen worden ist, so stellte ich zunächst Versuche mit Staphylococcus pyogenes aureus und Streptokokken an, setzte dieselben aber, da man doch von Silber nicht als einem Specificum gegen bestimmte Bakterienarten sprechen kann,

etwa wie vom Diphtherieserum gegen Diphtherie, sondern es vielmehr als ein allgemein gegen Infektionserreger jeder Art wirksames Antisepticum ansprechen muß, mit Milzbrand und Cholera fort, um den Einfluß desselben auf Infektion zu prüfen.

Versuche mit Staphylokokken.

Ich benutzte aus einer schweren Phlegmone beim Menschen frisch gezüchteten Staphylococcus pyogenes aureus. Nach Verimpfung auf ein Kaninchen, das 15 Stunden nach der intravenösen Injektion einer Bouillonaufschwemmung von 2 Oesen der genannten Staphylokokkenkultur verstarb, erhielt ich aus dessen Nieren und Herzblute Reinkulturen von für Kaninchen hochvirulentem Staphylococcus.

Versuch VI. Kaninchen I, weiblich, 2030 g schwer, wird als Kontrolltier benutzt. Demselben wurde in eine Ohrvene $^1/_5$ Oese des für Kaninchen hochvirulenten Staphylococcus eingespritzt.

Kaninchen II, weiblich, 2040 g wiegend, erhält in eine Ohrvene 0,1 Argentum colloïdale auf 5 ccm Aq. dest. injiziert. Nach 5 Minuten wird in die Randvene des anderen Ohres $^1/_5$ Oese derselben Staphylokokkenkultur injiziert.

Nach 4 Stunden betrug die Temperatur des Kontrolltieres 40,4°, die des mit Silber behandelten 40,8°, nach 12 Stunden, die des Kontrolltieres 39,7°, die des mit Silber behandelten 36,0°. Kaninchen II starb nach 22 Stunden. Das Kontrolltier dagegen starb erst nach $3^1/_2$ Tagen post injectionem, nachdem es am letzten Vormittage subnormale Temperaturen gehabt hatte. Beide Tiere hatten anhaltende Durchfälle, augenscheinlich septischer Natur. Die Sektion ergab bei dem mit Collargol behandelten Tiere eine minimale schwärzliche Verfärbung der Leber, Milz und der geschwollenen Lymphdrüsen, ebenso der Lungen. In der Darmschleimhaut fanden sich zahlreiche stecknadelkopf- bis linsengroße Hämorrhagieen, ebenso auf der Konvexität beider Nieren, an der Konvexität der linken Niere außerdem ein Absceß. Aehnlich war der Sektionsbefund des Kontrolltieres. Aus dem Herzblute und den Nieren beider Tiere gingen Reinkulturen von Staphylococcus aureus auf, welche ich für die drei folgenden Versuche, die ich gleichzeitig anstellte, benutzte.

Versuch VII. Kaninchen I, weiblich, Gewicht 1100 g, dient als Kontrolltier und erhält $^1/_8$ Oese der aus Versuch VI gewonnenen Kultur in eine Ohrvene injiziert.

Kaninchen II, weiblich, Gewicht 1150 g, erhält gleichfalls $^1/_8$ Oese derselben Kultur in eine Ohrvene eingespritzt. Nach 10 Minuten folgt die Injektion von 0,1 Collargol, in 5 ccm destillierten Wassers gelöst, in die Randvene des anderen Ohres. Die Temperatur beider Tiere war nach 3 Stunden annähernd normal (39,2° und 39,4°). Nach 6 Stunden betrug die Temperatur beim Kontrolltier 39,9°, beim mit Silber behandelten 40,1°. Nach 17 Stunden starb das Kontrolltier. Die sofort vorgenommene Sektion ergab Hämorrhagieen in beiden Nieren und dem Darmtraktus, sowie kleine, stecknadelkopfgroße Abscesse an der Konvexität beider Nieren. In den Ausstrichpräparaten aus Milz und Nieren konnte ich zahlreiche Staphylokokken nachweisen. Aus Herzblut und Nieren gingen Reinkulturen von Staphylococcus aureus massenhaft auf.

Das mit Silber behandelte Tier erhielt nach 13 Stunden, also

4 Stunden vor dem Tode des Kontrolltieres, eine abermalige Injektion einer Lösung, enthaltend 0,1 Arg. colloïdale in eine Ohrvene. Das Tier war um diese Zeit etwas matt, reagierte aber noch mit energischen Abwehrbewegungen, wenn man es an den Ohren emporzuheben versuchte. Unter Temperaturabfall starb es aber schon 7 Stunden nach der letzten Injektion, also im ganzen 20 Stunden nach der Infektion und 3 Stunden später als das Kontrolltier.

Die sofort vorgenommene Sektion ergab Hämorrhagieen in den Nieren, die eine blaßgelbrote Farbe hatten, sowie kleine, etwa stecknadelkopfgroße Abscesse in beiden Nieren. Leber und Milz waren schwärzlichbraun verfärbt; die Ausstrichpräparate aus Nieren und Herzblut zeigten massenhaft Staphylokokken; aus beiden gingen dementsprechend massenhaft Reinkulturen von Staphylococcus aureus auf.

Versuch VIII. Kaninchen I, weiblich, 1220 g wiegend, dient als Kontrolltier. Dasselbe erhält $^1/_9$ Oese der aus Versuch VI gewonnenen Staphylokokkenkultur in eine Ohrvene eingespritzt.

Kaninchen II, weiblich, 1280 g wiegend, erhält dasselbe Quantum derselben Kultur in die Ohrvene injiziert. Nach 10 Minuten Injektion von 0,1 Collargol, in 5 ccm destillierten Wassers gelöst, in die Randvene des anderen Ohres.

Nach 2 Stunden betrug die Temperatur bei beiden Tieren 40° und hielt sich annähernd auf derselben Höhe bis zum Abende des folgenden Tages. Am 3. Tage nach der Injektion starb das Kontrolltier; die sofort angestellte Sektion ergab Hämorrhagien in Nieren und Darmtraktus sowie zahlreiche geschwollene Lymphdrüsen. Ausstrichpräparate aus den Nieren zeigten reichliche Anwesenheit von Staphylokokken; dementsprechend gingen aus Herzblut, Nieren und Milz Reinkulturen von Staphylococcus aureus auf. Daneben entwickelte sich aber massenhaft der Bacillus der Kaninchenseuche.

Es dürfte mithin letzterer an dem frühen Tode des Kontrolltieres in hohem Grade mitbeteiligt gewesen sein. Beiläufig bemerkt, war das Tier vor Beginn des Versuches vollkommen gesund und kann sich nur nachträglich im Stalle infiziert haben.

Kaninchen II starb am 5. Tage nach der Impfung, nachdem die Temperatur am Tage vorher morgens $38,3_0$, mittags 38,1°, abends 37,4° betragen hatte. Die sofort vorgenommene Sektion ergab folgendes Bild: Herz und Lungen ohne Besonderheiten, Leber etwas vergrößert; am linken Lappen auf der Konvexität nahe dem scharfen Rande einige stecknadelkopfgroße Abscesse. Milz etwas vergrößert, prall, von dunkelblauroter Farbe. Follikelzeichnung deutlich ausgeprägt. Nieren blaßrotbraun, an der Oberfläche beider zahlreiche stecknadelkopf- bis linsengroße Abscesse; die sofort angelegten Ausstrichpräparate ergaben massenhafte Staphylokokken. Aus Nieren und Herzblut gingen Reinkulturen von Staphylococcus aureus auf.

Versuch IX. Kaninchen I, Kontrolltier, 1500 g wiegend, erhält in eine Ohrvene $^1/_{10}$ Oese der aus Versuch VI gewonnenen Staphylokokkenkultur injiziert.

Kaninchen II, Weibchen, Gewicht 1470 g, erhält eine Injektion von 0,1 Collargol, in 5 ccm Aq. dest. gelöst, in die Randvene eines Ohres. 10 Minuten später erhält es in eine Vene des anderen Ohres $^1/_{10}$ Oese derselben Staphylokokkenkultur eingespritzt. Die Körpertemperatur beider Tiere verhielt sich im Verlaufe des Versuches folgendermaßen.

	1. Tag.			
	nach 3 Stunden	6 Stunden	12 Stunden	
Kontrolltier	40,1	39,9	39,2	
Silbertier	40,8	39,6	40,3	
	2. Tag.			
	10 Uhr a. m.	1 Uhr p. m.	5 Uhr p. m.	9 Uhr p. m.
Kaninchen I	39,4	39,0	38,9	39,8
„ II	40,6	40,4	40,5	40,4
	3. Tag.			
Kaninchen I	39,1	39,1	39,2	39,0
„ II	40,0	39,8	39,4	38,7
	4. Tag.			
Kaninchen I	39,0	39,0	38,9	39,0
„ II	38,1	37,4	37,5	37,4
	5. Tag.			
Kaninchen I	39,0	39,1	39,1	39,1
„ II	37,3	37,2	37,0	37,3
	6. Tag.			
Kaninchen I	39,0	39,0	39,0	39,0
„ II	37,5	37,2	36,9	36,9

Während des Kontrolltier auch am 7. Tage seine normale Temperatur (39 °) behielt, hatte Kaninchen II andauernd subnormale. Beide Tiere litten während der Beobachtungsdauer an Durchfällen; das Kontrolltier verlor dieselben bereits am 4. Tage, das mit Silber behandelte dagegen behielt sie bis zu seinem am 8. Tage post infectionem erfolgten Tode. Bei der sofort vorgenommenen Sektion zeigte sich auf der Konvexität der Leber in der Nähe des scharfen Randes ein kirschkerngroßer Absceß. Darmtraktus und Nieren wiesen zahlreiche Hämorrhagieen bis zu Stecknadelkopfgröße auf. Die bakteriologische Untersuchung der Ausstriche von den wichtigsten Organen (Nieren, Milz, Leber) ergab massenhafte Staphylokokken; letztere gingen aus Herzblut und Nieren am folgenden Tage in Reinkultur auf.

Das Kontrolltier blieb am Leben. (Schluß folgt.)

Biochemische und differentialdiagnostische Untersuchungen einiger Bakterien mittels Phenolphtaleinnährböden.

[Aus dem K. K. Universitäts-Institute für Seuchenlehre des Prof. Dr. T. Kašparek in Prag.]

Von Dr. **Rudolf Zielleczky.**

Zur Bestimmung der Reaktion der Nährböden wird in vielen Laboratorien nach dem Vorschlag von Lehmann (1), Abel (2), Kornauth (1) und Anderer statt Lackmus das Phenolphtaleïn als Indikator verwendet, da, wie in der Mehrzahl der bakteriologischen Handbücher erwähnt wird: „die Neutralisation mit Lackmus als Indikator schwierig ist, weil schwer zu sagen ist, wann blaues Papier nicht mehr gerötet wird“.

Da dieses besonders empfindliche Reagens infolge seiner chemischen Zusammensetzung einige Eigenschaften verschiedener Nährböden, die

bei den bisher bekannten differentialdiagnostischen Untersuchungen zwischen Typhus und Coli benützt wurden, in sich vereinigt, habe ich auf Anregung des Herrn Prof. Kašparek verschiedene mit Phenolphtaleïn gefärbte Nährböden mit mehreren Bakterienarten geimpft, um etwaige durch diese hervorgerufene Aenderungen der Farbe des Nährbodens zu beobachten. Es erwähnt zwar schon Kashida (3) in seiner Arbeit, daß mit Phenolphtaleïn, welches gegen Säuren äußerst empfindlich ist, eine schärfere Differenzierung möglich sei, indem er seine Nährböden mit Milchzucker (2 Proz.) versetzte, um durch die Vergärung desselben eine vermehrte Säurebildung zu erzielen, ohne jedoch auf die differentialdiagnostischen Untersuchungen mit den Phenolphtaleïnnährböden näher einzugehen, indem er sich den Untersuchungen der nach der Säurereaktion bei Typhus und Coli später eintretenden Ammoniakentwickelung zuwendet. Auch Capaldi und Proskauer (4) versuchten schon bei der Lackmusmolke die Lackmuslösung durch andere Indikatoren zu ersetzen. Nach ihren Angaben waren aber „die gegen Säuren empfindlichen Reagentien für die Differenzierung der mit Molke versetzten Kulturen auf Grund des Säuregrades nicht zu brauchen“.

Aus diesem Grunde wählten wir im Gegensatze zu den Arbeiten der erwähnten Autoren zu unseren Untersuchungen nur die gewöhnlich gebrauchten Nährböden ohne irgendwelchen Zusatz, Peptonbouillon und Agar [1]).

Das Phenolphtaleïn schien uns für praktische Ausnützung zur kulturellen Differentialdiagnose aus folgenden Gründen besonders geeignet. Erstens wird es neben seiner starken Empfindlichkeit gegen Säuren, auch wegen der Schärfe des Farbenüberganges in Rot, die speziell bei Zusatz von Natronlauge sehr feine Unterscheidungen ermöglicht, vor Lackmus bevorzugt. Zweitens weil es sich bei der Titrierung mit Phenolphtaleïn nur um eine Farbe handelt, wodurch der Neutralpunkt viel prägnanter ist, als bei Lackmus, wo wegen der schwierigen Kontrollierbarkeit des Farbenumschlages die Reaktion schwieriger festzustellen ist.

Bei der Reaktionsbestimmung seiner Nährböden für Gonokokken fiel schon Thalmann (5) der Unterschied auf, je nachdem Phenolphtaleïn oder Lackmus angewendet wird, und führt die Mißerfolge anderer Autoren beim Kultivieren der Gonokokken auf einfachen Nährböden darauf zurück, daß von Manchen die Reaktionsbestimmung mit Lackmus vorgenommen wurde, indem er behauptet: „Zur Herstellung des Nährbodens für den Gonococcus läßt sich nur das Phenolphtaleïn als Indikator benützen, nicht aber Lackmus, da der günstigste Nährboden gegen Lackmus ziemlich stark alkalisch [2]), gegen Phenolphtaleïn aber noch sauer reagiert. . . . .“ „Da der Neutralpunkt für beide Indikatoren ein sehr verschiedener ist — spricht er — um Verwechslungen zu vermeiden, von lackmusneutral, phenolphtaleïnneutral, phenolphtaleïnsauer u. s. w.“ Zur Zeit unserer Versuche wurde auch von Pezzoli (6) in seiner Abhandlung „Ueber die Reaktion des Prostatasekretes bei chronischer Prostatitis“ in einer anderen Richtung auf den großen Unterschied zwischen der Empfindlichkeit dieser zwei Indikatoren aufmerksam gemacht. Er beweist, daß die ungleichen Resultate bei der

1) Die Peptonbouillon bestand aus $^1/_2$ kg Rindfleisch, 1 l H_2O, 10 g Pepton, 5 g NaCl, alkalisiert mit Na_2CO_3 — aus dieser wurden auch die Agarnährböden bereitet.

2) Auch bei der Prüfung unserer Bouillon zeigte sich bei der Prüfung mit Lackmus die alkalische Reaktion viel früher als bei der Prüfung mit Phenolphtaleïn.

Prüfung der Reaktion des Prostatasekretes bei den Untersuchungen von Lohnstein darin zu suchen sind, daß letzterer statt Lackmus das Phenolphtaleïn als Indikator benutzte. Pezzoli schreibt: „Schon Posner machte auf die Unzweckmäßigkeit des Phenolphtaleïns als Indikator aufmerksam. Die Thatsache ist auch den Bakteriologen bekannt, welche bei der Neutralisation peptonhaltiger Nährböden immer Lackmus, nie Phenolphtaleïn benützen, weil eine in der Reaktion richtig gestellte, auf Lackmus schwach alkalisch reagierende Nährgelatine mit Phenolphtaleïn oder Rosolsäure geprüft, saure Reaktion zeigt. Günther (7), Heim (8) und Abel äußern sich in demselben Sinne. ... Es zeigten also sämtliche Sekrete bei Untersuchung und Titrierung mit Lackmustinktur die richtige alkalische Reaktion, bedurften zu ihrer Neutralisierung Säurezusatz, während bei Anwendung von Phenolphtaleïn, um dessen Farbenumschlag zu bedingen, Alkali zugesetzt werden mußte, die Sekrete den Schein erweckten, sauer zu sein.“ Pezzoli beweist dies durch folgenden Versuch: „Wenn man zu einer 1-proz. Lösung von Pepton, welches durch mehrfaches Ausfällen rein und neutral gemacht wurde, etwas Phenolphtaleïn zusetzt, so tritt zunächst keine Farbenveränderung ein, die Peptonlösung verhält sich somit wie eine neutrale oder saure Lösung. Da wir aber zu dieser Lösung eine ansehnliche Menge von Alkali hinzusetzen müssen, um den Farbenumschlag zu bewirken — 5 ccm einer 1-proz. Peptonlösung benötigen das Hinzusetzen von 2,56 ccm einer $^1/_{100}$ Normalnatronlauge — so wird immer die Meinung erweckt, daß die Peptonlösung sauer ist, während sie, mit Lackmus geprüft, richtig neutral reagiert [1]).

Diese Angaben bewogen uns, uns vor Allem bei unseren Nährböden über die Unterschiede der beiden Indikatoren bei der Prüfung der Reaktion zu informieren. Die Prüfung unserer Bouillon- und Agarröhrchen führte zu ähnlichen Resultaten.

Tabelle I. Vergleichstitre.

Es brauchten 5 ccm	Rot verfärbt mit Phenolphtaleïn [Bouillon u. H_2O mit 0,8 ccm, Agar mit 1,0 ccm unserer Phenolphtaleïnlösung] [2])		Blau verfärbt mit 0,5 ccm unserer Lackmustinktur	
	$^1/_{100}$ $nC_4H_6O_6$	$^1/_{100}$ nNaOH	$^1/_{100}$ $nC_4H_6O_6$	$^1/_{100}$ nNaOH
Bouillon	3,9 ccm bis zum Verschwinden der Rotfärbung [3])	1,8 ccm bis zum Eintreten der Rotfärbung	8,9 ccm bis zum Farbenumschlag	1,1 ccm bis zum Erscheinen der blauen Farbe [4])
Agar	3,0 ccm do.	1,4 ccm do.	8,3 ccm do.	0,8 ccm do.
H_2O	3 gtts (= 0,1 ccm) do.	3 gtts do.	1,0 ccm	0,9 ccm

Dieser von Thalmann und Pezzoli betonte Unterschied zwischen der Phenolphtaleïn- und Lackmusreaktion, von dem wir uns auch bei

1) Pezzoli's Vergleichstabelle zwischen Phenolphtaleïn und Lackmus bei seinen Untersuchungen des Prostatasekretes:

Filtrierung mit Lackmustinktur		Filtrierung mit Phenolphtaleïn	
ccm Sekret	ccm $^1/_{100}$ Normalweinsäure	ccm Sekret	ccm $^1/_{100}$ Normal-NaOH
0,1	0,5	0,1	0,1
0,1	2,5	0,1	1,0
0,1	1,2 etc.	0,1	0,06 etc.

2) Welcher wir uns bei unseren Versuchen immer bedienten und deren Bereitung später angegeben werden soll.

3) Die ursprüngliche Rotfärbung war bei Bouillon und Agar ziemlich intensiv und bedeutend stärker als der beim mit NaOH durch Zurücktitrieren hervorgerufene Farbenton.

4) Welche viel schwächer war als der ursprüngliche blaue Ton.

dieser Gelegenheit selbst überzeugten, konnte bei unseren Versuchen nicht in die Wagschale fallen, da es sich uns behufs Erreichung der Rotfärbung des Nährbodens selbstverständlich nur um alkalische Nährböden handeln konnte.

Gerade in der Verwendung des Phenolphtaleïns lag für unsere Versuche ein Vorteil, da zu erwarten war, daß sich die peptonhaltigen Phenolphtaleïnnährböden bereits zu entfärben beginnen, wenn ihre Reaktion, mit gewöhnlichem Lackmuspapier geprüft, noch nicht neutral erscheint, was wir auch, wie später besprochen werden soll, bei unseren Versuchen bestätigt fanden. So war auch, wie wir uns nachher überzeugen konnten, zu erwarten, daß schon bei minimaler Säuremenge die beim Beginne der Kulturentwickelung oder bei Kulturen mit schwacher Säurebildung überhaupt auftritt, an der Nuance der Rosafärbung die Aenderung der Alkalität des Nährbodens sich bemerkbar machen wird.

Wie wir uns auch überzeugten, war bei der Coli-Kultur in der Phenolphtaleïnbouillon eine Veränderung in der Farbe einigemal bereits 6 Stunden nach der Impfung wahrnehmbar, während in dieselbe einfach mit Lackmustinktur schwach blau gefärbte Bouillon durch 5 Tage gänzlich unverändert blieb, welcher Umstand wahrscheinlich Kashida und Petruschky (9) dazu führte, ihren Nährböden Stoffe hinzuzufügen, um die Säurebildung in den Kulturen zu erhöhen und zu beschleunigen.

Ueber die bedeutend größere Empfindlichkeit des Phenolphtaleïns den Säuren gegenüber konnten wir uns durch folgenden einfachen Versuch überzeugen. Da bekanntlich und wie letzterzeit durch Scheurlen's (10) Untersuchungen gefunden wurde, von den Bakterien auch auf zuckerfreiem Nährboden Kohlensäure gebildet wird, prüften wir mit Phenolphtaleïn und Lackmus gefärbter Bouillon die Reaktion der freien CO_2. Zu diesem Zwecke ließen wir aus Reagensröhrchen, in welche einige Tropfen von gewöhnlichem Sodawasser gegossen wurden, durch Glasröhrchen in mit Phenolphtaleïn und mit Lackmustinktur verfärbte Bouillon Kohlensäure entweichen. In der Phenolphtaleïnbouillon löste die entweichende Kohlensäure die Reaktion viel früher als in der aus mit Lackmus verfärbten.

Außer der genannten Eigenschaft des Phenolphtaleïns mußte noch seine keimentwickelungshemmende Wirkung und seine Zusammensetzung berücksichtigt werden. Dadurch sind, wie bereits erwähnt wurde, in ihm alle Charaktere vereinigt, die bei der Herstellung von Nährböden zur Differenzierung zwischen Coli und Typhus bisher benutzt wurden.

Wegen seiner Verwandtschaft mit Phenol könnte es als ein zum Nährboden gemischtes, schwach antiseptisches Mittel angesehen werden, ähnlich wie zu diesem Zwecke von Graziani (11) das Formalin, von Vincent, Péré und Parietti (12) die Karbolsäure, von Schild (13), Uffelmann (14) u. A. verschiedene Antiseptica versucht wurden. Da es ferner im alkalischen Nährboden zum Farbstoff wird, wie viele in dieselbe chemische Gruppe gehörende Farbstoffe — wie Eosin, Fluoresceïn und andere Triphenylmethanfarbstoffe — so wäre auch bei unseren Phenolphtaleïnnährböden eine Aehnlichkeit mit den gefärbten Nährböden Rothberger's (15), Spina's (16), Nöggerath's (17), Kaufmann's (13) u. A. zu suchen.

Bei der Bereitung eines für unsere Zwecke geeigneten Phenolphtaleïnnährbodens galt es vor allem, die Grenze des Phenolphtaleïngehaltes festzusetzen, bei der noch deutliche Rosafärbung des Nährbodens zu erreichen wäre, ohne daß eine Störung im Wachstum der eingeimpften

Keime stattfindet, da, wie auch von Schürmayer (13) betont wird, das Phenolphtaleïn erst Alkalescenzdifferenzen anzeigt, die für manche Bakterien schon eine Entwickelungshemmung zur Folge haben.

Es wurde mit einer 1-proz. alkoholischen Lösung begonnen. Davon wurden 0,3 ccm mit 5 ccm Bouillon vermischt. In diese etwas trübe rosarote Lösung wurde nach vorausgegangener Sterilisation Bact. coli, B. typhi und cholerae eingeimpft. Von diesen 3 Bakterien konnte nach 24 Stunden nur bei B. coli ein Wachstum nachgewiesen werden, das von leichtem Schwinden der Rotfärbung begleitet war. Ein Zusatz von 0,10 ccm der 1-proz. Phenolphtaleïnlösung gab ebenfalls keinen günstigen Nährboden. Infolgedessen waren wir mit der Phenolphtaleïnmenge noch mehr heruntergegangen und haben dasselbe Quantum Bouillon mit 0,07 ccm der 1-proz. Phenolphtaleïnlösung versetzt, wodurch ein klarer rosaroter Nährboden entstand. In diesen Nährboden wurden die in der Tabelle II verzeichneten Bakterien geimpft und ihr Einfluß auf die Farbe des Nährbodens bei Brutschranktemperatur beobachtet. Zur Kontrolle wurde ein steriles Röhrchen mit der gleichen Menge mit Phenolphtaleïn gefärbter Bouillon in den Brutschrank miteingestellt.

Wie aus beistehender Tabelle II ersichtlich ist, konnte in verhältnismäßig kurzer Zeit eine deutliche Farbenveränderung des in dieser Konzentration mit Phenolphtaleïn verfärbten Nährbodens bei mehreren Bakterienarten konstatiert werden.

Tabelle II.

Bouillon-Kultur (5ccm Bouillon + 0,57 ccm 1-proz. Phenolphtaleïnlösung) von:	Wachstum	Farbenveränderung nach			
		12 Stunden	18 Stunden	24 Stunden	48 Stunden
B. coli commun.	+	sehr deutlich	noch stärker	fast vollständige Entfärbung	fast vollständige Entfärbung
B. typhi abdom.	+	unverändert	unverändert	sehr wenig	wie nach 24 Stunden
V. cholerae	+	do.	do.	deutlich	noch stärker
B. pyocyaneus	+	do.	do.	mittelmäßig	mittelmäßig
B. anthracis	+ wuchs im Vergleich mit anderen Bakt. viel langsamer	do.	do.	schwach	schwach
Bact. prodig.	+	do.	mittelmäßig	mittelmäßig	mittelmäßig
B. typhi mur.	+	do.	sehr deutlich	entfärbt sich am meisten	entfärbt sich am meisten
B. pseudotub. Moeller	+	do.	schwach	schwach	schwach
B. suisepticus	+	do.	stark	noch stärker	noch stärker
B. suipestifer	+	do.	unverändert	mittelmäßig	etwas deutlicher

Das Kontrollröhrchen blieb unverändert.

Diese Versuche bestärkten uns in der gehegten Erwartung. Empirisch fanden wir bei weiteren Untersuchungen, daß sich am besten

folgende Lösung als Zusatz zu den Nährböden eignet. $^1/_2$ g Phenolphtaleïn wird in 100 ccm einer Mischung von 50 ccm Wasser und 50 ccm abs. Alkohol aufgelöst und diese Lösung vor dem Gebrauche jedesmal frisch mit H_2O auf $^1/_{20}$ verdünnt (1 : 19). Davon werden dann 0,5 bis 0,1 ccm zu 5 ccm Bouillon zugesetzt. Wir bedienten uns auch bei allen weiteren Versuchen stets nur dieser Lösung und die angegebene Menge bezieht sich stets nur auf diese zweifache Lösung.

Die rot verfärbte Bouillon wurde dann sterilisiert, wodurch eine noch gleichmäßigere und deutlichere Rotfärbung erzielt wurde. Wir konnten uns auch bei allen unseren weiteren Untersuchungen überzeugen, daß sich der Zusatz von 0,7 ccm von der erwähnten Lösung zu unserer Bouillon am besten eignet, während sich 0,5 ccm als eine etwas schwache Verfärbung erwiesen hat. Die zweite Verdünnung, d. i. die 1:19-Lösung, muß vor dem Gebrauche jedesmal frisch bereitet werden, da sich in älteren Lösungen das Phenolphtaleïn, welches bekanntlich in Alkohol leicht, in H_2O fast gar nicht löslich ist, als unlösliches Pulver am Boden absetzt. Zu den Agarröhrchen mußte behufs deutlicher Rotfärbung etwas mehr von unserer Lösung beigegeben werden und zwar 1 ccm. Nach den erwähnten Voruntersuchungen handelte es sich nur darum, vor allem bei den verschiedenen Kulturen den Zeitpunkt der Entfärbung des Nährbodens zu bestimmen. Es wurden zuerst wie vorher Phenolphtaleïn-Bouillonröhrchen mit verschiedenen Bakterien beschickt und ihre Einwirkung auf den Nährboden bei der Brütschranktemperatur zu verschiedener Zeit beobachtet und zwar:

Tabelle III.

Bouillonkultur (5 ccm Bouillon + 0,7 ccm $^1/_2$-proz. Phenolphtaleïnlösung auf $^1/_{20}$ d. Volum. verdünnt von	Wachstum	Es trat folgende Farbenveränderung auf nach	
		8 Stunden	24 Stunden
B. coli I	+	entfärbt deutlich	entfärbt vollständig (dabei wird die Kultur trübe)
B. typhi II	+	„ nicht	entfärbt etwas (weniger wie bei Coli in 8 Stunden) und klar
B. typhi I	+	„ „	do.
Cholera	+	„ „	entfärbt am wenigsten von allen, viel weniger wie Metschnikoff (an der Oberfläche Häutchenbildung)
Metschnikoff	+ Alle Röhrchen ließen sich nach 24 Stunden mit Erfolg überimpfen.	„ deutlich	entfärbt sehr deutlich leicht orange gelb, fast zur ursprünglichen Farbe der Bouillon (an der Oberfläche ebenfalls ein Häutchen)

Das Kontrollröhrchen blieb unverändert.

Bei einer zweiten Reihe von Untersuchungen konnten wir uns überzeugen, daß besonders bei B. coli im Gegensatze zum B. typhi und bei V. Metschnikoff im Gegensatze zu V. cholerae die biochemische Reaktion schon nach verhältnismäßig sehr kurzer Zeit auffallend stark hervortritt, indem sie sich bei Coli und Metschnikoff schon nach 6-stündigem Verbleiben im Brütschrank beobachten ließ.

Tabelle IV.

5 ccm Bouillonkultur + 0,8 ccm 1/2-proz. Phenolphtaleïnlösung von	Wachstum	Es trat folgende Farbenveränderung auf nach		
		6 Stunden	8 Stunden	18 Stunden
B. coli II	+	deutliche Entfärbung	deutliche Entfärbung ins Gelbliche	trüb, hellorange
B. coli I	+	do.	do. (jedoch etwas schwächer wie voriges)	vollständige Entfärbung, die Kultur bleibt fast durchsichtig
B. typhi II	+	unverändert	unverändert	unverändert
B. typhi I	+	do.	do.	schwache Andeutung von Entfärbung
V. Metschnikoff	+	deutliche Entfärbung	deutliche starke Entfärbung	vollständige Entfärbung, hellgelb und klar
V. cholerae	+	unverändert	unverändert	viel schwächere Entfärbung wie bei d. anderen Bakt.
Bakt. des Rhinoskleroms	+	do.	do.	unverändert (außerdem schwaches Wachstum)
B. diphtheriae	— kein Wachstum	do.	do.	do.
Kontrolle	—	do.	do.	do.

Die Resultate der beschriebenen Untersuchungen veranlaßten uns, das verschiedene Verhalten der roten Farbe unserer Nährböden auf ihre praktische Verwertung zur Differentialdiagnose besonders zwischen B. typhi und B. coli eingehender durchzuprüfen. Der besonders auffallende Unterschied zwischen V. cholerae und V. Metschnikoff und anderen Vibrionen wie auch zwischen B. suisepticus und suipestifer in der Phenolphtaleïnbouillon soll Gegenstand separater Untersuchungen werden, über deren Ergebnisse in einem diesem Thema gewidmeten Aufsatze berichtet werden soll.

Für die nachfolgenden Versuche wählten wir uns Typhus- und Coli-Stämme aus, welche auf alle ihre charakteristischen und differentialdiagnostisch wichtigen Eigenschaften, wie Indolreaktion, Gasbildung, in der Petruschky'schen Lackmusmolke, Säurebildung und Agglutination durchgeprüft wurden. Zwei Typhuskulturen (mit I und II bezeichnet), die uns durch die Liebenswürdigkeit von Herrn Doc. Dr. Weleminsky zur Verfügung gestellt wurden, konnten auch ihrer Pathogenität und Provenienz nach mit Sicherheit als Typhusstämme angesprochen werden, da sie von 2 Typhusepidemieen stammten. Eine Coli- (III) und Typhus- (III) Kultur stammte aus dem hygienischen Institute des Prof. Kabrhel, ein Typhus (IV) und ein Coli (IV) aus dem serotherapeutischen Institute des Prof. Paltauf. Mit allen diesen Kulturen wurden die Versuche in der Phenolphtaleïnbouillon wiederholt und auch Untersuchungen auf gefärbten Agarnährböden unternommen. Zu gleicher Zeit wurden auch mit diesen Kulturen Parallelversuche mit gewöhnlicher Lackmustinktur und mit Petruschky'scher Lackmusmolke versetzten Nährböden angestellt. Auch diese Versuchsreihe führte, wie aus den folgenden Tabellen ersichtlich, zu einem befriedigenden Resultate.

Tabelle V. a) Versuche mit Bouillonkulturen (5 ccm Bouillon + 0,7 ccm verdünnter Phenolphtaleïnlösung).

Bei 37° Temperatur nach	5 Stunden	6 Stunden	7 Stunden	8 Stunden	9 Stunden	11 Stunden	15 Stunden	24 Stunden
B. typhi I	unverändert	unverändert	unverändert		kaum merkbar entfärbt	schwach entfärbt	wie vor 4 Stunden	entfärbt am schwächsten
B. typhi II	do.	do.	ganz wenig, kaum merkbar heller		etwas deutlicher entfärbt	do.	do.	die Bouillon bleibt klar wie nach 15 Stunden
B. coli I	do.	do.	deutlich entfärbt		Zunahme der Entfärbung	noch stärkere Zunahme d. Entfärbung	Zunahme d. Entfärbung	Zunahme der Entfärbung
B. coli II	do.	do.	do.		do.	do.	do. ganz schwach rosarot	behält nur noch einen ganz leichten rosaroten Anflug, leicht getrübt
B. typhi III	do.	do.	do.		do.	do.	do.	fast ganz entfärbt
B. coli III	etwas entfärbt	deutliche Entfärbung	do.		ganz entfärbt	ganz entfärbt	wie vor 3 Stunden	wie vor 9 Stunden
B. typhi IV	unverändert	unverändert	unverändert		unverändert	schwache Entfärbung	wie nach 11 Stunden	ganz entfärbt
B. coli IV	do.	deutlich entfärbt	deutlich entfärbt		ganz entfärbt	ganz entfärbt	ganz entfärbt	do.
Kontrolle im Brutschrank	do.	do.	unverändert	unverändert	unverändert	unverändert	unverändert	unverändert
Kontrolle bei Zimmertemperatur	do.	do.	do.	do.	do.	do.	do.	do.

b) Versuche mit 5 ccm gewöhnlicher Bouillon mit der gebräuchlichen Lackmustinktur (ca. 2 ccm) deutlich blau verfärbt.

	5 Stunden	6 Stunden	7 Stunden	8 Stunden	9 Stunden	11 Stunden	15 Stunden	24 Stunden
B. typhi I	unverändert	unverändert	unverändert	unverändert	unverändert	unverändert	unverändert	unverändert
B. typhi II	do.	do.	do.	do.	do.	do.	do.	do.

bei 37° Temperatur nach	5 Stunden	6 Stunden	7 Stunden	8 Stunden	9 Stunden	11 Stunden	15 Stunden	24 Stunden	36—48 Stunden
B. typhi III	unverändert	unverändert	unverändert	unverändert	unverändert	unverändert	unverändert	unverändert	
B. coli I	do.	do.	do.	do.	do.	do.	do.	do.	
B. coli II	do.	do.	do.	do.	do.	do.	do.	do.	
B. coli III	do.	do.	do.	do.	do.	do.	do.	do.	
B. coli IV	do.	do.	do.	do.	do.	do.	do.	do.	

Die Coli-Kulturen werden erst nach $2^1/_2$ Tagen etwas weniger blau.

c) Bouillon mit Petruschky'scher Lackmusmolke āā 2,50 ccm.

bei 37° Temperatur nach	5 Stunden	6 Stunden	7 Stunden	8 Stunden	9 Stunden	11 Stunden	15 Stunden	24 Stunden	36—48 Stunden
B. typhi I		unverändert	unverändert	unverändert	unverändert	unverändert	unverändert	unverändert	unverändert
B. typhi II		do.	do.	do.	do.	do.	heller	fast unverändert	fast unverändert
B. typhi III		do.	do.	do.	do.	do.	do.	do.	do.
B. coli I		do.	do.	do.	do.	do.	do.	unverändert	unverändert
B. coli II		do.	do.	do.	do.	do.	am deutlichsten entfärbt (gelblich-braun)	noch mehr entfärbt	Zunahme der Entfärbung, dabei Gasentwickelung, an d. Oberfläche ein leichter Schaum
B. coli III		do.	do.	do.	do.	do.			
Kontrolle		do.	do.	do.	do.	do.	unverändert	unverändert	unverändert

d) Agarstrichkulturen (4 ccm Agar + 1 ccm der verdünnten Phenolphtaleïnlösung). Erste Beobachtung.

bei 37° Temperatur nach	5 Stunden	6 Stunden	7 Stunden	8 Stunden	9 Stunden	11 Stunden	15 Stunden	24 Stunden	36—48 Stunden
B. typhi II		unverändert	unverändert	unverändert	—	—	nach 18 Stunden, entfärbt, jedoch schwächer als Coli, hauptsächlich in den oberen Partieen	die Entfärbung tritt in beiden Fällen gradatim noch deutlicher hervor	
B. coli I		do.	do.	Entfärbung			deutliche Entfärbung in den unteren Partieen		

e) Zweite Versuchsreihe mit Strichkulturen auf Phenolphtaleïnagar derselben Zusammensetzung.

bei 37° Temperatur nach	5 Stunden	6 Stunden	7 Stunden	8 Stunden	9 Stunden	11 Stunden	15 Stunden	24 Stunden	36—48 Stunden
B. typhi I	unverändert	unverändert	unverändert	unverändert	unverändert	ganz wenig heller	Agar gelblich gefärbt, Kondenswasser rosarot	gelb entfärbt	
B. typhi II	do.	do.	do.	do.	do.	do.	das untere Drittel rosa gefärbt, obere Partie gelb	do.	
B. coli I	do.	do.	do.	leichte Entbung	etwas heller	heller wie Typhus	ganz gelb bis zum Boden, a. Boden schwach rosa	do.	
B. coli II	do.	do.	do.	do.	wenig heller, speziell in d. ob. Partieen	hellorange	ganz gelb	rötlich gelb, rötlicher als Typhus	
Kontrolle	do.	do.	do.	unverändert	unverändert	unverändert	schwach rosa gefärbt	etwas heller	
f) Agarstrichkulturen (4 ccm Agar + 2 ccm Petruschky'scher Lackmusmolke).									
B. typhi I	unverändert	unverändert	unverändert	unverändert	unverändert	unverändert	unverändert	unverändert	
B. typhi II	do.	do.	do.	do.	do.	do.	do.	do.	
B. coli I	do.	do.	do.	do.	do.	do.	ein Stich ins rötliche	rot verfärbt, Gasblasenbildung	
B. coli II	do.	do.	do.	do.	do.	etwas heller	rötliche Farbe, zahlreiche Gasblasen	noch rötlicher verfärbt, Gasblasen	
Kontrolle	do.	do.	do.	do.	do.	unverändert	unverändert	unverändert	
g) Agarstrichkulturen (4 ccm Agar + 1 ccm verdünntes Phenolphtaleïn).									
B. typhi I	unverändert	unverändert	unverändert	unverändert	unverändert	unverändert	unverändert	unverändert	
B. typhi II	do.	do.	do.	do.	do.	do.	do.	do.	
B. coli I	do.	do.	do.	do.	ganz wenig heller	etwas heller	die Entfärbung nimmt zu	deutliche Entfärbung im oberen Drittel	
B. coli II	do.	do.	do.	do.	do.	do.	do.	die Entfärbung über zwei Drittel vorgeschritten	
Kontrolle	do.	do.	do.	do.	unverändert	unverändert	unverändert	in den oberen Partieen schwach gelblich	

Wie aus den beigefügten Tabellen ersichtlich, tritt die Farbenveränderung bei B. coli bedeutend früher auf als wie in den bisher empfohlenen Nährsubstanzen. Während Spina die Reduktion seiner mit Methylenblau verfärbten Nährsubstanzen erst nach 2 Tagen, Rothberger nach 24—48 Stunden beobachtet, Nöggerath die Entfärbung erst nach 3 × 24 Stunden wahrnimmt, Petruschky das Auftreten der Säureeinwirkung, die bei unseren Versuchen laut Tabelle V in Lackmusmolkebouillon und Agar erst in 11—15 Stunden eingetreten ist, den 2. Tag konstatiert, Kashida die nach einigen Tagen wiederkehrende ursprüngliche blaue Farbe bei Lackmus und rote bei Phenolphtaleïn zur Differenzierung vorschlägt, sind wir mit unseren Phenolphtaleïnnährböden schon in 5—8, spätestens 9 Stunden imstande, die Reaktion des B. coli festzustellen. Leider läßt sich der Phenolphtaleïnagar, abgesehen davon, daß bei demselben die Entfärbung viel später eintritt als bei den Phenolphtaleïn-Bouillonkulturen, in dünnen Schichten besonders zum Plattengießen und zur Differenzierung der Kolonieen nicht verwerten, da wir uns überzeugen konnten, daß in zu dünnen Agarschichten die rote Verfärbung verschwindet und ein stärkerer Zusatz von Phenolphtaleïn aus den früher angeführten Gründen nicht zulässig ist. Am schiefen Agar differenzierte sich Coli von Typhus recht deutlich, indem der mit B. coli beschickte Teil des Agars schon in 8—9 Stunden deutlich gelb wurde, während bei Typhus die Entfärbung erst um die 15. Stunde herum begann.

Infolge der erwähnten verschiedenen chemischen Eigenschaften unseres Nährbodenfärbemittels fanden wir es für angezeigt, die entfärbten Kulturen auf ihre Reaktion zu prüfen. Auch in diesem Falle machte sich der große Unterschied in der Empfindlichkeit des Phenolphtaleïns gegenüber der des Lackmus bemerkbar. Alle in der Tabelle IV verzeichneten Kulturen, ein Kontrollröhrchen und in gewöhnlicher ungefärbter Bouillon gewachsene Coli- und Typhuskulturen, wurden zuerst mit blauem und rotem Lackmuspapier auf ihre Reaktion geprüft. Alle Röhrchen, in welchen nach 6—8 Stunden die rote Färbung verschwunden war, ließen das blaue Lackmuspapier unverändert, ähnlich wie bei den Versuchen mit gewöhnlicher Bouillon, welcher Lackmustinktur bis zur deutlichen Blaufärbung zugesetzt wurde (Tabelle Vb) und in welcher Typhus und Coli eingeimpft wurden. In allen Phenolphtaleïnbouillon entfärbenden Kulturen färbte sich rotes Lackmuspapier schwach blau in ziemlich gleichem Farbenton.

Um sich von dem Säuregrade der durch die Bakterien entfärbten Phenolphtaleïnnährböden zu überzeugen, wurden dieselben wie auch die gleichen Mengen von Coli- und Typhuskulturen desselben Alters und aus demselben Nährboden ohne Phenolphtaleïn titrimetrisch auf ihre Reaktion geprüft. Die Titrierung mit n-NaOH-Lösung und mittels Phenolphtaleïn als Indikator ergab auch sauere Reaktion bei allen Coli-Kulturen, welche mit denjenigen gleichen Alters waren, durch welche unsere Nährböden entfärbt wurden.

Die Titrierungen unserer Coli- und Typhuskulturen ergaben, daß die Säureentwickelung bei Typhus viel später eintritt und quantitativ viel schwächer ist. Es wurde ähnlich wie von Kashida und Rambousek[1]) (18), welche die Acidität der durch B. coli und B. typhi

1) Nebenbei sei bemerkt, daß in der Mitteilung Rambousek's einige Male konsequent von einer Differenzierungsmethode von Goldberger Erwähnung gethan wird.

vergärten Nährsubstrate prüften, auch in der gebräuchlichen einfachen Bouillon das rasche Ansteigen der Acidität in den ersten 48 Stunden beobachtet und zwar geschah dies bei unseren Untersuchungen schon nach 18—20 Stunden, worauf die sauere Reaktion allmählich verschwand, um (nach 3 Tagen) der alkalischen Platz zu machen, während bei Typhus die Acidität nach 20 Stunden zwar geringer war, aber doch noch immer langsam gestiegen ist. Und zwar war die Acidität der Coli-Kulturen stets doppelt so stark wie die der Typhuskulturen. Im Momente der Entfärbung der Phenolphtaleïn-Bouillonkultur von B. coli, d. i. nach 6—7 Stunden, waren die Typhuskulturen entweder noch immer neutral oder noch schwach alkalisch. Nach 3 Tagen konnten wir bei unseren Coli-Kulturen ähnlich wie Kashida die Rückkehr der Rotfärbung der entfärbten Nährböden beobachten. Bei Typhus geschah dies erst um 20, 24—30 Stunden später. Ueber diese Differenz in der Zeit und Menge der Säurebildung hatten wir uns bei allen unseren Coli- und Typhusstämmen unzählige Male überzeugen können, wodurch wir die Brauchbarkeit unserer Nährböden zur Differenzierung dieser 2 Bakterien an praktischem Werte gewinnen sahen.

Die in den Kulturen durch Coli oder Typhus zum Schwinden gebrachte Rotfärbung konnte auch jedesmal bei der Titrierung durch Zusatz von NaOH in derselben Stärke reproduziert werden. Nur bei über 3 Wochen alten Kulturen hatte das Reagens in der Kultur eine Veränderung erfahren, höchst wahrscheinlich durch Zersetzung. Nach dieser Zeit konnten selbst durch Zusatz von größeren Mengen $^1/_{100}$ n-NaOH nicht mehr zur ursprünglichen Rotfärbung gebracht werden, während die sterilen Phenolphtaleïn-Bouillonröhrchen, dem Tageslichte ausgesetzt, bei Zimmertemperatur ihre ursprüngliche Farbe behielten. Viel mehr schien die höhere Temperatur auf die Rotfärbung etwas einzuwirken. Sterile rot gefärbte Bouillon wurde nach längerem Aufbewahren im Brutschrank nach einigen Tagen blässer. Beim Kochen verschwand die rote Farbe in der Bouillon vollkommen, im Gegensatze zu alkalischen wässerigen Lösungen unserer Phenolphtaleïnlösung, welche auch beim Kochen ihre rote Farbe nicht änderten. Bei unseren Versuchen mit Mischkulturen von Coli und Agar auf schiefem Agar bemerkten wir, daß bei denselben das Agar nach der vorausgegangenen Entfärbung etwas früher und viel intensiver wieder rot wurde als bei den Reinkulturen dieser beiden Bakterien. Dies veranlaßte uns, auch Mischkulturen von Coli und Typhus in Phenolphtaleïnbouillon anzulegen und zu verschiedener Zeit ihre Reaktion titrimetrisch zu bestimmen. Diese Untersuchungen schienen uns nicht unwichtig, da es uns nicht ausgeschlossen zu sein schien, dadurch zur Kenntnis des Antagonismus dieser zwei Mikroben etwas Näheres beitragen zu können, da schon von anderen Autoren (19), besonders aber von Rémy (20) der gegenseitige Einfluß dieser zwei Mikroorganismen im Wasser, in den Stühlen von Typhuskranken wie auch in den Kulturen auf ihre chemisch-biologischen Eigenschaften nachgewiesen wurde. So wird von Rémy in seinen für die Beurteilung der Lebensfähigkeit des B. typhi und Coli communis im Wasser und Darme nicht unwichtigen Abhandlungen über den Antagonismus dieser zwei Mikroorganismen angeführt, daß „durch die Symbiose wesentlich ihre charakteristischen Eigenschaften

---

Dies soll jedoch, wie wir uns auch nach seiner Litteraturangabe überzeugten, die bereits von uns erwähnte Methode von Rothberger bedeuten.

gegenseitig beeinflußt werden können, indem infolge längeren Zusammenlebens der Bac. typhi seine Empfindlichkeit gegen Agglutinine, das Bac. coli seine spezifischen Charaktere wie Gas- und Indolbildung einbüßt."

Auch bei unseren Untersuchungen machte sich der Antagonismus dieser zwei Mikroben bemerkbar. Die Mischkulturen in Phenolphtaleïnbouillon entfärbten sich viel langsamer und später als die zum Vergleiche geimpften Reinkulturen von Coli.

Noch auffallender aber war der Unterschied bei der Titrierung einzelner Kulturen. Diesbezügliche Versuche wurden folgendermaßen angestellt:

Es wurde bei reinen Typhus- und Coli- und zugleich auch bei Mischkulturen von beiden in gewöhnlicher Bouillon und in unserer Phenolphtaleïnbouillon (à 5 ccm und bei den Mischkulturen auch à 10 ccm) gleichen Alters die Acidität titrimetrisch bestimmt. Außerdem wurden auch Coli- und Typhuskulturen gleichen Alters erst nachträglich vermischt und gleich darauf titriert. Die meisten Versuche in dieser Richtung wurden mit in gewöhnlicher Bouillon gezüchteten Kulturen vorgenommen. Die Aciditätsbestimmung derselben geschah in der Weise, daß stets dieselbe Menge von der 1-proz. Phenolphtaleïnlösung zugesetzt wurde, worauf $^1/_{100}$ Normalnatronlauge, bei älteren schon alkalisch reagierenden Kulturen $^1/_{100}$ Essigsäure zugegeben wurde, bis dieselbe Verfärbung erreicht wurde wie bei derselben Menge steriler Bouillon, welche mit derselben Menge von Phenolphtaleïn rot gefärbt war. Um stets die gleiche Nuance der Rotfärbung zu erreichen, wurde in gleich dicken und gleich langen Reagensröhrchen titriert und die titrierten Kulturen mit destilliertem Wasser stets auf dieselbe Volummenge verdünnt. Zur Aciditätsbestimmung wurden deswegen Nährböden ohne Phenolphtaleïnzusatz verwendet, da sich zur Titrierung ein stärkeres Rot eignete, welches, wie schon früher erwähnt wurde, erst mit für die Entwickelung der Bakterien hemmenden Mengen von Phenolphtaleïn erreicht werden kann. Es wurde auch weiter konstatiert, daß Mengen über 0,7 ccm der angegebenen Phenolphtaleïnlösung auch auf die Entwickelung der Acidität bei den Coli-Kulturen von Einfluß waren, indem bei der Titrierung von Coli-Kulturen gleichen Alters in der entfärbten Phenolphtaleïnbouillon viel weniger $^1/_{100}$ NaOH-Lösung gebraucht wurde als bei den in der gewöhnlichen Bouillon kultivierten. Wie aus Tabelle VII ersichtlich ist, war der Säuregrad der Mischkulturen, in gleicher und auch in doppelter Menge Bouillon gezüchtet, im Verhältnis zu den Coli-Reinkulturen desselben Alters und Stammes und auch zwei nachträglich gemischten Coli- und Typhuskulturen auffallend geringer (s. Tab. VI u. VII).

Es werden daher die Mischkulturen viel weniger sauer als dieselbe Menge von Typhus- und Coli-Kulturen desselben Alters zusammen. Es macht also das B. coli in Symbiose mit B. typhi den Nährboden viel schwächer phenolphtaleïnneutral (um die Bezeichnung Thalmann's anzuwenden) oder phenolphtaleïnsauer, als seine Reinkultur in gleicher Menge desselben Nährbodens.

Nachdem Rémy bei seinen Untersuchungen beobachtete, daß seine Typhus- und Coli-Kulturen in der Symbiose nach ca. 3 Monaten an ihren verschiedenen charakteristischen Merkmalen, die ihnen in Reinkulturen eigen waren (wie beim B. coli die Eigenschaft, Gas und Indol zu bilden) versuchten wir es ebenfalls, aus einer Mischkultur von

Typhus und Coli nach 11 Wochen das B. coli zu isolieren und auf seine Eigenschaften, die ihm in der Reinkultur eigen waren, zu prüfen. Dasselbe, mittels Prüfung auf Agglutination im Typhusserum als B. coli

Tabelle VI.

Versuche mit Mischkulturen in Phenolphtaleïnbouillon und Agar.

Kultur	nach 5 Stunden	nach 7 Stunden	nach 9 Stunden	nach 11 Stunden	nach 15 Stunden	nach 24 Stunden
Coli II 5 ccm Bouillon	unverändert	entfärbt	stark entfärbt	Zunahme der Entfärbung	nur noch ganz schwach rosa gefärbt und trüb	ganz entfärbt
Typhus II 5 ccm Bouillon	do.	etwas heller	Entfärb. nimmt zu	die Entfärb. nimmt zu	leicht entfärbt und klar	ganz entfärbt und klar
Mischkultur von Typhus u. Coli 5 ccm Bouillon	do.	etwas schwäch. entfärbt als Coli	stärkere Entfärb.	noch stärkere Entfärbung	schwach rosa gefärbt	weniger als Coli entfärbt
Mischkultur von Typhus u. Coli 10 ccm Bouillon	do.	unverändert	schwach entfärbt	do.	do.	do.
Coli II 5 ccm Bouillon	do.	stark entfärbt	ganz schwach rosa gefärbt	ganz schwach rosa gefärbt	vollständig entfärbt	vollständig entfärbt
Typhus I 5 ccm Bouillon	do.	do.	do.	etwas wenig entfärbt	etwas wenig entfärbt	ganz entfärbt und klar
Mischkultur von Typhus u. Coli	do.	unverändert	unverändert	ganz wenig entfärbt	entfärbt, jedoch bedeutend weniger als Coli	entfärbt, jedoch bedeutend weniger als Coli
Typhus II Agarstrichkultur	do.	do.	do.	ganz wenig heller	das untere Drittel rosa, das obere Drittel gelb	ganz gelblich entfärbt
Coli I Agarstrichkultur	do.	ganz leicht entfärbt	etwas heller bes. in d. oberen Partieen	hellorange	ganz gelb bis zum Kondenswasser, dasselbe rot	fängt an wieder rötlich zu werden
Mischkultur von Typhus u. Coli Agarstrichkultur	do.	unverändert	do.	etwas weniger entfärbt wie Coli	ganz entfärbt, jedoch weniger als Coli	rötlichgelb
Typhus II Agarstichkultur	do.	do.	do.	unverändert	unverändert	ganz schwach oben entfärbt
Coli II Agarstichkultur	do.	do.	ganz wenig heller	die Entfärb. nimmt zu	Zunahme der Entfärbung	die Entfärb. ist über $^2/_3$ vorgeschritten
Mischkultur von Typhus u. Coli Agarstichkultur	do.	do.	do.	etwas heller	etwas heller	die Entfärb. deutlich etwa bis zur $^1/_2$ vorgeschritten

	B. coli					B. typhi			Mischkulturen von B. coli und B. typhi in 5 ccm			Mischkulturen von B. coli und B. typhi in 10 ccm			B. coli und B. typhi à 5 ccm zusammengegossen		
	Kulturmenge in ccm	Kulturstamm	Alter	Titre $^1/_{100}$ n-NaOH	Titre $^1/_{100}$ n-$C_4H_6O_6$	Kulturstamm	Titre $^1/_{100}$ n-NaOH	Titre $^1/_{100}$ n-$C_4H_6O_6$	Kulturstamm	Titre $^1/_{100}$ n-NaOH	Titre $^1/_{100}$ n-$C_4H_6O_6$	Kulturstamm	Titre $^1/_{100}$ n-NaOH	Titre $^1/_{100}$ n-$C_4H_6O_6$	Kulturstamm	Titre $^1/_{100}$ n-NaOH	Titre $^1/_{100}$ n-$C_4H_6O_6$
Gewöhnliche Bouillon ohne Phenolphtaleïn	5 ccm	II	6 Stunden	0,35		I	0,0					Typhus I Coli II	0,4				
	5 „	„	12 „	2,9		„	1,9					do.	5,1				
	5 „	„	20 „	3,4		„	2,5					do.	4,7				
	5 „	„	24 „	2,5		„	2,9					do.	5,2				
	5 „	„	3 Tage	0,0		„	2,2					do.	2,1				
	5 „	III	8 Stunden	4,2		III	0,9					Coli III Typhus III	4,9				
	5 „	„	12 „	5,8		„	1,9					do.	5,8				
	5 „	„	18 „	6,8		„	2,9					do.	7,2				
	5 „	I	12 „	2,7		II	1,8					Coli I Typhus II	4,7				
	5 „	„	20 „	3,1		„	2,4					do.	4,4				
	5 „	„	24 „	2,7		„	2,9					do.	4,95				
	10 „	IV	18 „	8,9		IV	4,9					Coli IV Typhus IV	8,4				
	10 „	II	20 „	7,6		„	6,5					Coli II Typhus IV	6,9				
	5 „	IV	18 „	4,5		„	2,3		IV/IV	4,1							
	10 „	„	18 „	8,9		„	4,9					TyIV/IVColi	8,4				
	10 „	II	24 „												II Ty II Coli	3,9	
Bouillon m. Phenolphtaleïnzusatz	10 „	„	24 „									Ty II/II Coli	3,6				
	5 „	III	18 „	5,2													
	5 „	I	24 „	2,9		III	1,4					Coli I/III Ty	1,9				
	5 „	„	48 „	1,6		„	1,8					Coli I/III Ty	1,4				
	5 „	„	4 Wochen	7,2		II	7,6[1])										
Gewöhnliche Bouillon ohne Phenolphtaleïnzusatz	5 ccm	Mischkultur Coli II Ty. I	20 Stunden	1,2													
	5 „	urspr. Kultur Coli II	20 „	3,4													

1) Die ursprüngliche Farbe konnte auch mit großen Mengen von $^1/_{100}$ n-NaOH-Lösung nicht hervorgebracht werden.

diagnostiziert, zeigte, wie konstatiert werden konnte, nach 20 Stunden in der Bouillonkultur einen viel geringeren Säuregrad als die Kultur aus dem ursprünglichen als Reinkultur weiter gezüchteten Coli-Stamm. Was die Gasbildung anbelangt, war dieselbe geschwunden; Indolbildung konnte nur in sehr geringem Grade nachgewiesen werden.

Die Ergebnisse der beschriebenen Untersuchungen lassen folgende Schlüsse zu:

Durch den Zusatz von schwacher Phenolphtaleïnlösung (0,8—0,7 ccm von auf $^1/_{20}$ verdünnter $^1/_2$-proz. Lösung) zu den gebräuchlichen Nährböden wird das Wachstum der Bakterien nicht beeinträchtigt.

Bei Zusatz von größeren Mengen von der angegebenen Phenolphtaleïnlösung als 0,8 ccm zur Bouillon und 1 ccm zum Agar entwickelt sich Coli noch ganz gut, entwickelt aber sehr oft weniger Säure, während beim B. typhi (bei Zusatz von 0,3 ccm 1-proz. Lösung zu 5 ccm Bouillon) das Wachstum aufhört.

Die mit Phenolphtaleïn gefärbten Nährböden werden durch Coli bedeutend früher und intensiver als durch B. typhi entfärbt. B. coli entfärbt die Phenolphtaleïnbouillon gewöhnlich schon nach 5 Stunden, spätestens in 7 Stunden, den Phenolphtaleïnagar in 8 Stunden.

In der Symbiose mit dem B. typhi abdominalis produziert das B. coli in gleicher Zeit verhältnismäßig viel weniger Säure als seine Reinkultur desselben Alters.

Durch langes Zusammenleben des B. coli mit dem B. typhi abdominalis wird bei B. coli die Fähigkeit, Säure zu produzieren, bedeutend verringert.

In praktischer Hinsicht wären die Phenolphtaleïnnährböden als differentialdiagnostischer Behelf deswegen zu empfehlen, weil die Bereitung derselben im Gegensatze zu den bisher empfohlenen Nährböden — besonders zu der Petruschky'schen Lackmusmolke, die auch viel schwieriger herzustellen ist — jederzeit und ungemein leicht möglich ist und weil außerdem in denselben viel früher die Wirkung des durch die eingeimpften Bakterien hervorgerufenen biochemischen Prozesses auf den Nährböden wahrzunehmen ist.

Am Schlusse dieser Arbeit erfülle ich eine angenehme Pflicht, indem ich Herrn Prof. Kašparek meinen verbindlichsten Dank für die besondere Liebenswürdigkeit ausspreche, mit der er mir bei diesen Untersuchungen mit Rat und That beistand.

Litteratur.

1) Kornauth, Bakteriologische Untersuchungsmethoden. p. 15.
2) Abel, Taschenbuch für die bakteriologischen Praktikanten. 4. Aufl. p. 10.
3) Kashida, Differenzierung der Typhusbacillen vom B. coli communis durch die Ammoniakreaktion. (Centralbl. f. Bakt. etc. Bd. XXI. No. 20, 21. p. 802.)
4) Capaldi und Proskauer, Beiträge zur Kenntnis der Säurebildung bei Typhusbacillen und B. coli. (Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. Bd. XXIII. p. 452.)
5) Thalmann, Züchtung der Gonokokken auf einfachen Nährböden. (Centralbl. f. Bakt. etc. Bd. XXVII. p. 828.) — Zur Biologie der Gonokokken. (Ebenda. Bd. XXXI. No. 14. p. 678.)
6) Pezzoli, Ueber die Reaktion des Prostatasekretes bei chronischer Prostatitis. (Wiener klin. Wochenschr. 1902. No. 27. p. 697.)
7) Günther, Einführung in das Studium der Bakteriologie. 4. Aufl. p. 120.
8) Heim, Lehrbuch der bakteriologischen Untersuchungen. 1. Aufl. p. 208.

9) Petruschky, Bakteriologisch-chemische Untersuchungen. (Centralbl. f. Bakt. etc. No. 23. p. 625.)
10) Scheurlen, Zur Kenntnis der Gasbildung der Bakterien. (Internat. Beitr. zur inneren Med. Bd. II. 1902. p. 203.)
11) Graziani, Ricerche sperimentali sulla formalina. (Ref. i. Centralbl. f. Bakt. etc. Bd. XXV. No. 18/19. p. 683.)
12) Roux, Précis d'analyse microbiologique des eaux. p. 213.
13) Schild, Die pathogenen Spaltpilze. (Schürmayer's Med. Bibliothek. Leipzig.)
14) Uffelmann, Die Dauer der Lebensfähigkeit von Typhus- und Cholerabacillen in Fäkalmassen. (Centralbl. f. Bakt. etc. Bd. V. No. 15. p. 497 u. No. 16. p. 529.)
15) Rothberger, Differentialdiagnostische Untersuchungen mit gefärbten Nährböden. (Centralbl. f. Bakt. etc. Bd. XXIV. p. 513 u. Bd. XXV. No. 1. p. 15 u. No. 2/3. p. 69.)
16) Spina, Bakteriologische Versuche mit gefärbten Nährsubstanzen. (Centralbl. f. Bakt. Bd. II. p. 71.)
17) Nöggerath, Centralbl. f. Bakt. etc. Bd. III. p. 481.)
18) Rambousek, Příspěvek kotázce rozpoznání bacilla tyfi a bakteria coli. (Rozpravy české akademie. R. IX. c. 19. 1900.)
19) Lubarsch-Ostertag, Ergebnisse. III. Jahrg. I. Abt. p. 211.
20) Rémy, L., Contribution à l'étude de la fièvre typhoide et de son bacille. (Ann. de l'Institut Pasteur. Année XIV. No. 8. p. 513. No. 11. p. 705. Année XV. No. 3. p. 553.)

Inhalt.

Originalmitteilungen.

Frommannsche Buchdruckerei (Hermann Pohle) in Jena.

CENTRALBLATT

für

Bakteriologie, Parasitenkunde und Infektionskrankheiten

Erste Abteilung:

Mediz.-hygien. Bakteriologie u. tier. Parasitenkunde

Originale

In Verbindung mit

Geh. Med.-Rat Prof. Dr. Loeffler, Prof. Dr. R. Pfeiffer, Prof. Dr. M. Braun
Greifswald Königsberg i. Pr.

herausgegeben von

Dr. O. Uhlworm in Berlin W., Schaperstr. 2/3 I

Verlag von Gustav Fischer in Jena

XXXII. Band. —— Jena, den 17. November 1902. —— **No. 11.**

Preis für den Band (50 Bogen) 15 Mark. Schwierige Tafeln werden einem Bogen gleich gerechnet. — Die Nummern erscheinen zwanglos je nach dem vorliegenden Stoffe. Bei Einzelverkauf Preis für einen einfachen Druckbogen 40 Pfg., für eine Tafel 60 Pfg.

Hierzu als regelmäßige Beilage die Inhaltsübersichten der II. Abteilung des Centralblattes.

Die Redaktion des „Centralblatts für Bakteriologie und Parasitenkunde" richtet an die Herren Mitarbeiter die ergebene Bitte, etwaige Wünsche um Lieferung von besonderen Abdrücken ihrer Aufsätze entweder bei der Einsendung der Abhandlungen an die Redaktion auf das Manuskript schreiben zu wollen oder spätestens nach Empfang der ersten Korrekturabzüge direkt an den Verleger, Herrn Gustav Fischer in Jena, gelangen zu lassen.

Original-Mitteilungen.

Les races coli bacillaires. Etude de la séro-réaction individuelle[1]).

Par le Dr. G. Cany, La Bourboule,
Ex-assistant volontaire à la k. k. Pädriat. Klinik de Graz.

Avec 1 tableau.

Il est une question, dans la pathologie des infections digestives chez l'enfant, que de nombreux auteurs se sont attachés à élucider sans arriver encore à une entente parfaite. Il s'agit du rôle joué dans ces infections par le Bacterium coli commune.

Avant l'apparition des nouvelles méthodes bactériologiques, de la séro-réaction agglutinative en particulier, il n'avait pas été possible

1) Communiqué au VI° Congrès français de Médecine interne à Toulouse, 1902.

d'établir une distinction entre le coli vulgaire, hôte de l'intestin, bactérie saprophyte ordinaire et le coli pathogène, reconnu dans certaines affections déterminées comme le provocateur direct de ces affections. On sait en effet que des échantillons de ce bacille doués de propriétés biologiques identiques peuvent posséder une virulence absolument différente et que, inversement, à virulence égale, les caractères de deux échantillons peuvent varier dans de fortes proportions.

Cependant la séro-réaction obtenue sur des organismes nettement spécifiques, sur l'Eberth en particulier, sur le choléra par Achard et Bensaude, sur la fièvre de Malte par Wright et enfin sur d'autres microbes pathogènes: pneumocoque, bacille de Nocard, bacille de la peste, de la diphtérie etc., ... cette réaction devrait logiquement provoquer sur le coli des résultats analogues.

Lesage, l'un des premiers qui a appliqué au coli la séro-réaction dans les infections gastro-intestinales, avait obtenu des résultats tellement concluants qu'il avait considéré un coli spécial comme spécifique des diarrhées d'été.

Mais ces expériences furent contrôlées plus tard par Nobécourt qui se servit de la méthode des mensurations. Cet auteur démontra que Lesage était allé trop loin dans ses conclusions; Nobécourt considéra au contraire la séro-agglutination comme incapable d'établir des distinctions entre les différentes races de coli-bacilles trouvées dans les gastro-entérites. Il traita cette méthode d'inconstante.

Cette manière de voir, si différente de celle de Lesage, ne fut cependant pas unanimement adoptée. A la clinique de Graz notamment, plusieurs faits nouveaux vinrent modifier la portée des conclusions de Nobécourt. Escherich avait en effet trouvé deux formes indiscutables de coli-bacillose: l'une la coli-cystite des petits enfants, l'autre la coli-colite, dans lesquelles Pfaundler constata l'existence d'une coli-séro-réaction fortement positive et absolument analogue à la réaction de Widal vis-à-vis de l'Eberth. Un cas notamment, publié à la suite d'un travail de Brudzinski, fut encore plus catégorique: Chez un enfant gravement atteint de coli-colite, on obtint dans le début de l'affection, et avec le sang du malade, une réaction fortement positive sur les colis retirés en culture pure de son intestin. Trois jours après, la réaction tentée de nouveau sur les colis des nouvelles selles fut négative. Cela prouvait donc que la race pathogène étrangère avait sûrement disparu et qu'une race inoffensive, une race commune, normale, sur laquelle le sérum des malades est toujours sans action, avait pris sa place. Le fait devint plus évident encore à l'autopsie: on put, avec les colis pris directement sur les parties malades de l'intestin, obtenir la même réaction positive, alors que les résultats furent toujours négatifs avec les colis retirés des portions voisines saines. Il existait donc vis-à-vis d'un coli manifestement pathogène une réaction particulière et spécifique.

Cette constatation fut encore confirmée à la clinique de Graz par les travaux postérieurs de Smith's et de Kreisel. Le premier de ces auteurs, Smith, isolant les coli bacilles des selles d'un nourrisson normal au sein et, immunisant des animaux avec ces échantillons, obtint un sérum qui agglutinait tous les échantillons issus de la même selle. Répétant l'expérience avec le même sérum sur des selles du même enfant prises à des dates postérieures, il obtenait encore une réaction positive; en outre l'influence de l'alimentation ne semblait jouer aucun

rôle, puisque la modification du régime alimentaire (allaitement artificiel) n'amena qu'un léger affaiblissement du pouvoir agglutinant. Smith constata de plus que ce sérum restait sans action sur les échantillons des selles d'autres nourrissons également normaux et également nourris au sein. C'était donc là une réelle réaction spécifique pour l'espèce isolée chez l'individu lui-même, c'était une „réaction individuelle“, „eine Individualreaktion“, comme il l'appelle dans son article.

Le Dr. Kreisel reprit ces expériences, les poursuivit chez des adultes et obtint des résultats absolument identiques.

D'une part donc le désaccord des auteurs français sur l'existence d'une coli-séro-réaction dans les gastro-entérites, désaccord provenant sans doute d'une différenciation insuffisante des cas observés, d'autre part, les résultats indéniables d'Escherich et de Pfaundler dans des affections nettement définies, et enfin, les conclusions de Smith's et Kreisel sur la réaction individuelle, amenèrent Escherich à exposer au congrès de médecine interne de 1899 à Karlsbad, une interprétation nouvelle des faits.

Par leur séjour dans le tube digestif d'un individu, les bactéries de l'intestin, et les coli-bacilles en particulier, subissent, pense-t-il, des modifications spéciales, une individualisation qui dépend vraisemblablement du milieu sur lequel ils se développent. Escherich avait en effet déja démontré que les sécrétions intestinales servaient bien plutôt de milieu de culture aux colis que les déchets de la digestion. Ce bacille, très sensible probablement à l'influence du milieu, acquiert dans chaque intestin différent des caractères différents et forme chez chaque individu une race coli-bacillaire personnelle, „eine persönliche Coli-Rasse“. Cette race peut garder sa réaction individuelle à travers de nombreuses générations successives et malgré les variations des milieux de culture sur lesquels on transporte ses échantillons.

Les infections pathogènes s'expliquent pour lui simplement par l'introduction vraisemblable de l'extérieur d'une race étrangère: Le cas de Brudzinski, résumé plus haut, en serait une preuve. Le défaut était donc d'expérimenter les races pathologiques complexes avant de connaître les races normales. Il était surtout intéressant de confirmer cette hypothèse d'Escherich de l'existence d'une race personnelle et de voir comment se comporterait cette réaction individuelle, décrite par Smith, dans des circonstances variées.

C'était le but de nos recherches. Nous nous sommes adressé au cas le plus simple: Au nourrisson normal allaité au sein. Malheureusement nous n'avions à notre disposition, à la section des nourrissons de Graz, que des enfants malades, nés avant terme, débiles, dyspeptiques. Cette constatation doit entrer en ligne dans l'interprétation de nos résultats.

Nous avons choisi trois enfants au sein à peu près normaux, ou donnant au moins des selles normales.

Les deux premiers enfants I et II nous ont servi de cas de contrôle. Nous avons d'abord ensemencé une selle de chacun des cas I, II et III sur agar et gélatine et les échantillons de coli obtenus ont été vérifiés, ainsi d'ailleurs que tous ceux de nos expériences, au point de vue de la fermentation de la glucose, coagulation du lait, culture sur pomme de terre, indol et motilité.

Nous avons alors injecté à des animaux quelques uns de ces échantillons, à fin d'immunisation.

La quantité a varié de 1 à 2 cc, en une ou deux fois, aux lapins, et de 0,5 à 1 cc, en une ou deux fois, aux cobayes.

Nous avons ainsi obtenu: Un sérum I, un sérum II et trois sérums III; nous avons d'abord fait agir chacun de ces sérums sur les échantillons de la selle du même nom: sérum I sur selle I, sérum II sur selle II, etc. . . . . . C'est la réaction dite iso-homologue avec l'échantillon lui-même injecté à l'animal (jaune sur le tableau) et la réaction dite homologue avec les autres échantillons (bleu sur le tableau).

Nos résultats ont été tous positifs de 1:50 à 1:500. C'est la confirmation de l'existence de la réaction individuelle. Le cas No. 1 seul ne nous paraît pas très pur. Il se peut que dans ce cas de début nous ayons laissé échapper quelque faute de technique[1]).

Nous avons alors expérimenté chacun de ces sérums sur les selles de numéros différents, par exemple: Les sérums I et II sur les cultures III et le sérum III sur les colis des selles II. C'est la réaction strictement hétérologue (noir sur le tableau).

Comme l'indique le tableau, ces différents essais doivent être considérés tous comme négatifs: En effet un sérum normal, privé de toutes propriétés immunisantes est capable d'agglutiner déjà au taux de 1:5. Nous appellerons douteuses les réactions au dessous de 1:15.

Les résultats positifs des réactions iso-homologues et homologues et les résultats négatifs des hétérologues confirment encore l'existence d'une réaction individuelle.

Nous avons alors continué la série des expériences sur le cas III, sur l'enfant Prasser Anton, pour savoir comment se comporterait la réaction individuelle à plusieurs jours de distance.

Treize jours après l'ensemencement de la selle III, nous avons pris une nouvelle selle, soit III A. Malheureusement, l'aspect de cette selle n'était plus idéal, elle était légèrement muqueuse et la flore examinée au microscope par la méthode Weigert-Escherich donnait un aspect un peu différent de la selle III: Les bacilles décolorés, rouges étaient devenus plus abondants; ce qui est relativement anormal chez un enfant nourri au sein.

Injection d'échantillons de cette selle à des animaux et obtention de deux sérums III A.

Les réactions individuelles c'est-à-dire l'action des sérums III A sur les échantillons de la selle III A sont toutes positives à une forte proportion. Nous avons alors éprouvé la réaction individuelle à date éloignée, c'est-à-dire des sérums III A sur la culture III et inversement des sérums III sur la culture III A.

Sur 18 essais, nous avons eu 11 réactions positives de 1 : 15 à 1:500; 4 douteuses et 3 négatives, dont 2 sur une espèce étrangère: le Lactis aërogenes.

Les faibles résultats du sérum du lapin III_3 proviennent sans doute de ce que cet animal n'a reçu qu'une seule injection de 1 cc tandis que le lapin $III A_5$ a reçu deux fois 2 cc en 15 jours. Conclusion: La race individuelle s'est conservée à peu près intégralement après un intervalle de 13 jours.

Il était alors intéressant de rechercher comment se comporterait cette réaction après une modification des conditions biologiques de l'intestin.

---

1) La méthode employée pour l'agglutination est celle décrite par Mauro Yatta. (Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. Bd. XXXIII. 1900.)

Le Dr. Tissier, dans sa remarquable thèse sur la flore intestinale normale et pathologique du nourrisson, a constaté qu'après l'administration d'un purgatif (Calomel) à un nourrisson au sein, la flore se modifiait d'une façon très sensible: „Cette modification consiste, dit-il en une raréfaction évidente de l'espèce dominante, en sa transformation de formes normales en formes mortes ou en formes de souffrance et en une multiplication des formes aérobies, cocci et cocco-bacilles (Bacterium coli) et surtout de cette dernière espèce. Mais, dit-il plus loin, fait important, dans tous les cas, dans les diarrhées légères où le microscope ne révèle qu'un changement peu important dans la constitution de la flore, comme dans les diarrhées prolongées, comme dans les formes graves, où la modification est profonde, les ensemencements montrent presque toujours, dans les cultures, des espèces nouvelles, des espèces que l'on ne rencontre pas dans une selle d'un enfant bien portant.“

Il était donc intéressant de voir si les modifications de la flore générale n'entraîneraient pas en même temps une modification des races coli-bacillaires et, par contre-coup, une variation de la séro-réaction individuelle.

Nous avons donc donné à l'enfant Prasser, non 0,005 mg de calomel, comme recommande Tissier, mais 0,01 cg pour obtenir une modification rapide et appréciable. Nous avons recueilli la selle III B, la première après l'ingestion du calomel; elle a donné peu de modifications macro- et microscopiques; néanmoins, l'action des sérums III A sur les échantillons III B (No. 1 à 10) ont donné, sur 12 expériences, 2 résultats faiblement positifs, au-dessus de 1 : 15, dont un seul à 1 : 50, 9 résultats douteux au-dessous 1 : 15 et 1 négatif.

Deux jours après nous avons donné une nouvelle dose de calomel, soit 0,02 cg et recueilli, au bout de 8 heures, la selle III C. L'aspect de cette selle est sensiblement différent de celui des selles précédentes. Macroscopiquement, elle est liquide, verdâtre, très muqueuse, microscopiquement, les formes colorées (bacilles bleus) sont moins nombreuses et les éléments décolorés (éléments rouges) sont en grande abondance; on remarque des formes épaissies, des formes en massues, formes de souffrance de Tissier.

Nous faisons d'abord agir sur les échantillons de coli, isolés de cette selle, les différents sérums actifs.

Le sérum étranger II donne le minimum de réaction.

Le sérum III A, c'est-à-dire celui de la seconde selle normale du cas Prasser, donne également sur 7 essais, 6 résultats douteux et 1 absolument négatif.

Nous avons alors injecté des échantillons de cette selle III C à divers animaux et obtenu le sérum III C.

La réaction personnelle (iso-homologue et homologue) sur les échantillons III C donne, sur 4 essais, 4 résultats fortement positifs.

Expérimenté alors sur les échantillons III A, il donne, sur 6 épreuves, 6 résultats à peu près négatifs.

Sur 4 échantillons de la selle III B au contraire (selle après 0,01 cg de calomel), nous obtenons 3 résultats fortement positifs au-dessus de 1 : 150 et 1 douteux au-dessous de 1 : 15.

Nous avons enfin tenté une nouvelle épreuve avec le calomel. Nous avons administré 0,03 cg et obtenu la selle III D. Cette selle à présenté les modifications microscopiques typiques si bien décrites par Tis-

sier: abondance des cocci, des formes en massue, des formes bifurquées et des formes de souffrance de toutes sortes, enfin apparition de formes nouvelles (formes grêles décolorées).

Les échantillons III D sont alors expérimentés avec les sérums III et III A; sur 5 épreuves, nous avons obtenu 3 résultats négatifs et 2 douteux.

Expérimentés au contraire avec le sérum III C, les 4 expériences tentées ont été toutes 4 positives jusqu'à 1 : 150.

La réaction individuelle primitive paraît donc avoir été influencée par l'action du calomel en ce sens que les réactions des sérums primitifs sur les selles modifiées et inversement du sérum modifié sur les selles primitives paraissent avoir subi un affaiblissement notable. D'autre part, il semble exister une analogie de réaction évidente de la part du sérum modifié sur les selles modifiées par le calomel.

Enfin il était intéressant de savoir comment se comporterait la même réaction vis-à-vis de sérums différents après un certain temps de repos. Nous devons remarquer en passant que l'action du calomel a produit chez cet enfant un effet très favorable: les selles muqueuses et verdâtres du début se sont peu à peu améliorées comme aspect, couleur et consistance et leur flore elle-même, examinée au microscope, a donné une végétation très proche de la normale (bacilles bleus prépondérants, bacilles rouges peu abondants — coloration Weigert-Escherich).

Vingt jours après la dernière prise de calomel, nous avons recueilli une dernière selle, et obtenu les échantillons de coli III E.

Avec le sérum III C, obtenu pendant la médication, l'agglutination a été très faible: 3 résultats douteux au-dessous de 1 : 15 et 1 moyennement positif au-dessous de 1 : 50.

Avec le sérum III A, la réaction a été également faible, 1 douteux et 3 faiblement positifs à 1 : 15.

Mais avec les sérums III, avec le sérum III_3 surtout, les résultats ont été plus intéressants: sur 8 expériences nous avons eu 3 résultats fortement positifs de 1 : 50 à 1 : 500, 3 résultats moyennement positifs au-dessus de 1 : 15 et 2 douteux.

Conclusion: Après le retour de la flore intestinale à la normale, il semble se produire un retour de la réaction individuelle vis à vis des sérums normaux du début tandis que la réaction spéciale et différente constatée pendant la médication au calomel semble vouloir s'atténuer.

S'est-il agi là de l'introduction d'une race étrangère? Nous ne pouvons, d'après ce cas unique, chez cet enfant malheureusement anormal, débile (1500 g à la naissance), dont les selles ont présenté, en dehors de toute cause appréciable, des variations assez notables, nous ne pouvons, disons-nous, établir, sur ces bases, une loi définitive et confirmer absolument l'hypothèse d'Escherich sur l'existence d'une race personnelle de coli-bacilles.

Nous pouvons seulement conclure:

1) La réaction individuelle, décrite par Smith, est confirmée dans nos expériences par les cas I, II et III.

2) Cette réaction individuelle a été retrouvée 15 jours après environ très peu modifiée.

3) Après un trouble artificiel apporté dans les conditions biologiques intestinales par le calomel, cette réaction a été très amoindrie, et après la troisième dose de ce médicament on peut même dire supprimée.

Origine des Selles
I Hornbache
4 Semaines-Nourri a

4) Par contre, la réaction nouvelle présentée par la flore modifiée par le calomel s'est montrée sensiblement constante pendant toute la durée de la modification.

5) Enfin, après le retour à l'état normal, la réaction individuelle supprimée a reparu.

Nous prions en terminant le professeur Escherich de recevoir notre profonde gratitude pour l'accueil cordial que nous avons trouvé auprès de lui dans son ancienne clinique de Graz.

Nous ne voulons pas oublier non plus les aimables assistants de la clinique, qui nous ont tous témoigné tant d'amitié et une si sincère et si franche collégialité. Nous prions notre charmant confrère et ami, le Privat-Docent Pfaundler, d'accepter en leur nom notre profonde sympathie.

Bibliographie.

Bensaude, Thèse. Paris 1897.
Brudzinski, J., Ueber das Auftreten von Proteus vulgaris in Säuglingsstühlen.... (in Nachtrag). (Jahrb. f. Kinderheilk. Bd. LII. 1900.)
Escherich, Zur Kenntnis der Darm-Colibacillen. (Verhandlungen des XVII. Kongresses f. inn. Med. in Karlsbad 1899.)
— —, Die Bedeutung der Bakterien in der Aetiologie der Magendarmerkrankungen der Säuglinge. (Dtsch. med. Wochenschr. 1898. No. 40—41.)
— —, Ueber Streptokokkenenteritis im Säuglingsalter. (Jahrb. f. Kinderheilk. Bd. XLIX. 1899. p. 2—3.)
Gilbert, De la Colibacillose. (Semaine méd. 1895.)
Kreisel, Studien über Colibacillen. (Centralbl. f. Bakt. etc. Abt. I. Bd. XXIX. 1901.)
Lesage, Contribution à l'étude des entérites infantiles. — Séro-diagnostic. — Des races de bactérium coli. (Compt. rend. de la soc. de biol. 1897. 16 octobre.)
— —, Infections et intoxications digestives. (Traité des maladies de l'enfance. T. II. 1897.)
— —, A propos de l'infection gastro-intestinale des jeunes enfants. (Soc. de biol. 1898. 3 déc.)
Mauro Yatta, Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. Bd. XXXIII. 1900.)
Nobécourt, De la non-spécificité des Coli-bacilles des infections gastro-intestinales des jeunes enfants. (Compt. rend. de la soc. de biol. 1898. 26 nov.)
— —, Recherches sur la pathogénie des infections gastro-intestinales des jeunes enfants. [Thèse.] Paris 1899.
Pfaundler, Ueber sero-diagnostische Fragen in der Pädiatrie. (Münch. med. Wochenschr. 1898. 25. Okt.)
Smith, Centralbl. f. Bakt. etc. Bd. XXV. 1899. No. 20.
Tissier, Thèse. Paris 1900.
Widal, F., Soc. de biol. 1897. 16 oct.
Widal, F. et Nobécourt, A propos du séro-diagnostic de la diarrhée infantile. (Soc. de biol. 1898. 3 déc.)

Fragen und Probleme der modernen Malariaforschung.

Von Dr. **Reinhold Ruge,** Marineoberstabsarzt und Privatdocent.

Mit 1 Tafel und 1 Figur.

Es ist durchaus nicht meine Absicht, im Folgenden alle die Fragen und Probleme, die die Malariaforschung zur Zeit noch bietet, aufzurollen. Ich will im Gegenteil nur einige wenige, zu deren Lösung ich einen Beitrag zu liefern hoffe, in den Kreis meiner Betrachtungen ziehen.

Seit der Entdeckung von Ronald Ross[1]) (1897), daß die Stechmücke Anopheles unter bestimmten Voraussetzungen imstande ist, bestimmte Formen der menschlichen Malariaparasiten in ihrem Körper zur Weiterentwickelung zu bringen, ins Ungeheure zu vermehren und dann durch ihren Stich wieder auf den Menschen zu übertragen, ist die Malariaforschung zu einem gewissen Abschluß gebracht worden. Namentlich die Epidemiologie der Malariafieber, die bis dahin auf sehr unsicheren Füßen stand, hat durch diese Entdeckung endlich eine sichere Grundlage erhalten. In ähnlich günstiger Weise ist entsprechend die Hygiene der Malaria gefördert worden, während die Klinik der Malariafieber naturgemäß keinen Vorteil von dieser Entdeckung haben konnte. Nun sollte man zwar annehmen, daß namentlich die Parasitologie der Malaria, die seit 22 Jahren auf das Eingehendste bearbeitet worden ist, durch die Ross'sche Entdeckung ein abgeschlossenes Ganze geworden wäre und Streitpunkte von prinzipieller Bedeutung nicht mehr aufwiese; indes dem ist nicht so.

Gerade in diesem Kapitel bestehen noch prinzipielle Meinungsverschiedenheiten, die noch ihrer definitiven Entscheidung harren. Ich will nun zu ihrer Besprechung übergehen und im Anschluß hieran einige Fragen aus der Epidemiologie und Pathogenese der Malariafieber erörtern.

I. Parasitologisches.

A. Frage der Einheitlichkeit der Malariaparasiten.

So merkwürdig es klingt: Gleich die erste prinzipielle Frage der Parasitologie der Malariafieber ist zur Zeit noch unentschieden. Es ist nämlich bis jetzt noch keine Einigung darüber erzielt worden, ob wir es mit einer oder mehreren Malariarparasitenarten zu thun haben. Die meisten Autoren nehmen zwar an, daß wir es wenigstens mit 3 Malariaparasitenarten zu thun haben, und es würde daher kaum lohnen, über diese Frage zu sprechen; indes Laveran[2]), der Entdecker der Malariaparasiten, steht nach wie vor auf dem Standpunkt, daß der Malariaparasit polymorph aber einheitlich ist und daß die grundlegenden Untersuchungen Golgi's[3]), durch die der genannte Autor die Tertian- von den Quartanparasiten trennte (1885/86), lediglich Künsteleien wären. Die weitere Abtrennung des kleinen Tropenfieberparasiten als einer besonderen Art durch Marchiafava und Celli[4]) (1890) erkennt Laveran ebenfalls nicht an.

---

1) Brit. Med. Journ. 1897. 18. XII.
2) Traité du Paludisme. 1898. p. 74.
3) Fortschr. d. Medicin. 1886. p. 575.
4) Berl. klin. Woch. 1890. p. 1010.

Hören wir nun zunächst, welche Gründe Laveran bestimmen, den Malariaparasiten für polymorph aber einheitlich zu erklären. Er führt in seinem großen Werk „Traité du Paludisme“ (1898) kurz zusammengefaßt etwa Folgendes aus:

1) Zunächst sind die 3 angeblichen Malariaparasitenarten in ihren Jugendformen nicht voneinander zu unterscheiden und zweitens sind die verschiedenen Merkmale, durch die sich diese 3 angeblichen Arten unterscheiden sollen, durchaus nicht konstant.

2) Die Halbmonde, die sich in der That durch ihre besondere Form auszeichnen, sollen nur bei den Sommer-Herbst-Fiebern (Tropenfieber) vorkommen. Das stimmt nicht. Laveran beobachtete sie auch bei Tertian- (13 mal) und Quartanfiebern (2 mal). Dafür fehlen sie aber oft bei den unregelmäßigen Fiebern.

3) Es kommt auch vor, daß man erst nur Halbmonde, später nur amöboide oder diese beiden Formen zusammen findet. Um diese Thatsachen erklären zu können, müssen die Anhänger der Pluralität der Malariaparasiten annehmen, daß Mischinfektionen häufig sind.

4) Daraus, daß sich die Halbmonde häufig bei den perniziösen Fiebern finden, darf man nicht schließen, daß sie dieselben hervorrufen. Denn sie kommen durchaus nicht immer bei diesen Fiebern vor und andererseits findet man sie häufig bei Kranken, die nie an perniziösen Anfällen gelitten haben. Also sind die Halbmonde nicht einer bestimmten Fieberart eigentümlich.

5) Man hat für die Verschiedenheit der Malariaparasiten die Erfolge der Impfungen mit Malariablut ins Feld geführt. Man hat behauptet, daß durch Ueberimpfen von Malariablut beim Geimpften derselbe Fiebertypus erzeugt worden wäre, an dem der Stammimpfling litt, daß also nach einer Impfung mit Tertianablut beim Geimpften ein Tertianfieber auftrat oder nach Impfung mit Quartanablut ein Quartanfieber u. s. w. Das ist aber durchaus nicht immer der Fall gewesen.

6) In allen Ländern findet man den Malariaparasiten in allen seinen verschiedenen Formen, so die Halbmonde neben amöboiden Formen in Algier, Tunis, Italien, Rußland, Deutschland u. s. w. Das ist ein Beweis dafür, daß es sich um einen einheitlichen Parasiten handelt. Denn wenn es mehrere Arten gäbe, so würden sich wahrscheinlich in bestimmten Gegenden nur Quartan- oder nur Tertian- oder nur unregelmäßige Fieber finden. Aber man findet immer alle 3 Arten nebeneinander.

7) Auch die pathologische Anatomie zeigt die Einheitlichkeit der Malariafieber: Melanämie und Milzschwellung sind allen Malariafiebern gemeinsam.

8) Dieselbe Behandlungsart ist für alle Fieber anwendbar.

9) Das Fieber ändert oft seinen Typus bei demselben Kranken. Der Fiebertypus kann sich selbst verändern, wenn die Kranken die Fiebergegenden verlassen haben, also Neuinfektionen nicht mehr ausgesetzt sind. Um das zu erklären, müssen die Pluralisten annehmen, daß verschiedene Arten des Parasiten zu gleicher Zeit im Körper vorhanden sind und abwechselnd die Oberhand gewinnen.

Das sind im großen und ganzen die Gründe, die Laveran für die Einheitlichkeit des Malariaparasiten anführt. Sie sind aber zu einer Zeit aufgestellt worden, als die grundlegenden Entdeckungen von Ross (1897) und Mac Callum[1]) (1897) eben erst gemacht und ihre Folgen sich

1) Lancet. 1887. 13. XI.

noch nicht geltend gemacht hatten. Die Entdeckungen R. Koch's[1]), die ebenfalls zur definitiven Klärung der in Rede stehenden Frage beigetragen haben, waren damals aber noch gar nicht gemacht. Wenn wir nun die von Laveran für die Einheitlichkeit des Malariaparasiten aufgestellten Gründe im Lichte dieser neuen Forschungen betrachten, so müssen die meisten als nicht mehr stichhaltig fallen. Aber gehen wir die Laveranschen Gründe zunächst erst einmal der Reihe nach durch.

Ad 1) Die 3 Malariaparasitenarten sind in ihren Jugendzuständen (Ringform) nicht zu unterscheiden. Diese Behauptung ist nur zum Teil richtig. Es ist zwar nicht möglich, einen kleinen Tertian- und Quartanring stets mit Sicherheit an einem großen Tropenring zu unterscheiden: es lassen sich aber stets die kleineren und mittleren Tropenringe von den kleinen Tertian- und Quartanringen unterscheiden. Ausnahmen in dieser Beziehung kommen vor. So ist z. B. ein kleiner, etwa 6 Stunden alter Quartanring manchmal nicht von einem mittleren Tropenring zu unterscheiden. Das kommt aber selten vor. Andererseits sind die Unterscheidungsmerkmale zwischen den halb- oder ganzerwachsenen Formen der verschiedenen Parasitenarten konstant und deutlich. Es kommt z. B. nie vor, daß ein von einem aktiven Quartan- oder Tropenparasiten befallenes rotes Blutkörperchen aufquillt und verblaßt, und es kommt nie vor, daß ein von einem aktiven Quartan- oder Tropenparasiten befallenes rotes Blutkörperchen bei der Romanowsky-Färbung die bekannte, charakteristische Tüpfelung annimmt. Die Unterscheidung zwischen halberwachsenen Quartan- und fast erwachsenen Tropenparasiten kann allerdings manchmal auch im gefärbten Präparate schwierig sein.

Ad 2—4) Die unter diesen Nummern von Laveran aufgeführten Gründe werden durch die Thatsache widerlegt, daß in den Halbmonden die Gameten des Tropenfieberparasiten erkannt worden sind. Es ist also gar nicht nötig, daß, wie Laveran meint (ad 3), immer Mischinfektionen bestehen müssen, wenn amöboide Formen und Halbmonde zusammen gefunden werden. Im Gegenteil! Seit wir wissen, daß die Halbmonde aus den sogenannten amöboiden Formen des Tropenfieberparasiten hervorgehen, wissen wir auch, daß beide Formen Glieder einer Parasitenart sind: Die Halbmonde sind die geschlechtlichen, die amöboiden Formen die ungeschlechtlichen Individuen des Tropenfieberparasiten. Wir wissen zwar noch nicht, wie sich die Entwickelung der Halbmonde im einzelnen abspielt, wissen aber, daß die Halbmonde aus den sogenannten amöboiden Formen hervorgehen. Ziemann[2]), der einmal einen Halbmond aus einer endoglobulären Form hervorgehen sah, beschreibt den Vorgang folgendermaßen: „Mit einem plötzlichen Ruck schnellte sich der runde mit beweglichem Pigment versehene Körper in die Breite. Es bildete sich die nierenförmige Figur des Halbmondes, an der konkaven Seite überspannt von der schon oft beschriebenen, feinen, bogenförmigen Linie, die man als Rand des entfärbten roten Blutkörperchens auffaßt."

Andererseits allerdings kommen Mischinfektionen zwischen den Tropenfieberparasiten einerseits und dem Quartan- resp. Tertianparasiten andererseits gar nicht so selten vor, und diese Thatsache erklärt dann, daß zugleich mit den großen Parasiten Halbmonde gefunden werden. Daraus darf aber nicht geschlossen werden, daß die Halbmonde allen

---

1) Deutsch. Med. Woch. 1899. Nr. 37; 1900. Nr. 5, 17, 18, 25, 46, 49, 50.

2) Ziemann, Ueber Blutparasiten bei heimischer und tropischer Malaria. (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Bd. XX. p. 664. 1896.)

Fieberarten eigentümlich sind. Da, wo das Tropenfieber fehlt, wie z. B. in Deutschland, fehlen bei den einheimischen Fiebern auch die Halbmonde. Es sind in Deutschland wohl auch Halbmonde bei Malariakranken gefunden worden; diese Kranken, bei denen sie gefunden wurden, hatten aber ihre Malariafieber nicht in Deutschland, sondern in Ländern, in denen das Tropenfieber vorkommt, erworben (Vergl. Ad 6).

Ad 5) Es ist in der That nicht immer durch Ueberimpfung von Malariablut beim Geimpften derselbe Fiebertypus wie beim Stammimpfling erzeugt worden. Das hat aber seinen Grund nicht in der von Laveran angenommenen Einheitlichkeit des Malariaparasiten, sondern darin, daß bei den ersten Versuchen nicht darauf geachtet worden ist, ob der Stammimpfling nicht etwa früher an einer anderen Fieberform gelitten hatte, als diejenige war, die zur Zeit der Blutentnahme bestand. Wurden doch diese Versuche vorwiegend in Malariländern gemacht, in denen alle 3 Fieberarten heimisch waren. Es war also nicht ausgeschlossen, daß auch der Geimpfte von einer früheren, durch eine andere Parasitenart bedingten Malariaerkrankung etwas zurückbehalten hatte. So ist z. B. in den von Laveran mitgeteilten Impfungen nur in einem einzigen Falle [1]) angegeben, daß der Stammimpfling an einem Erstlingsfieber litt und auch der Geimpfte früher nie Fieber gehabt hatte. Bei diesem Versuche wurde auch der Fiebertypus des Stammimpflings (Quartanfieber) beim Geimpften wieder erzeugt.

Ad 6) Der erste Satz ist schon zu Ende von ad 4 widerlegt worden. Der zweite Satz kann ebenfalls durch die in Deutschland bestehenden epidemiologischen Verhältnisse widerlegt werden. Wir finden bei uns wohl Tertian- und ganz seltene Quartanfieber, es ist aber bis jetzt niemals ein Fall von einheimischem Tropenfieber bei uns in Deutschland durch Blutuntersuchung festgestellt worden. Zudem hat R. Koch auf seiner letzten Expedition in der Südsee Inseln gefunden, die er Quartana-Inseln nannte, weil auf ihnen nur Quartanfieber zur Beobachtung kamen — Tertian- und Tropenfieber aber fehlten. Außerdem machte R. Koch die wichtige Entdeckung, daß Leute, die gegen Tertian- und Quartanfieber immunisiert sind, nicht gegen Tropenfieber immun sind und umgekehrt. Das beweist also klar, daß wir es in der That mit 3 verschiedenen Malariaparasiten zu thun haben.

Ad 7) Die pathologisch-anatomischen Befunde sind bei den verschiedenen Malariafiebern doch nicht so gleichartig als Laveran angiebt. Ich möchte zunächst daran erinnern, daß Milzschwellung, die bei den durch die beiden großen Parasitenarten hervorgerufenen intermittierenden Fiebern konstant oder fast konstant ist, beim Tropenfieber doch verhältnismäßig häufig fehlt oder nur angedeutet ist. Auch finden sich die Teilungsformen des Tropenfieberparasiten — schwere, ganz akut verlaufende Fälle ausgenommen — nur in den Kapillaren innerer Organe, wie Gehirn, Milz und Knochenmark, nicht aber in der peripherischen Circulation, während sie bei den großen Parasitenarten regelmäßig im peripherischen Blute vorkommen.

Ad 8) Dieselbe Behandlungsweise ist allerdings für alle Malariafieber anwendbar, wenn man darunter die Anwendung des Chinins überhaupt versteht. Indes auch dies ist kein Beweis für die Einheitlichkeit der Malariaparasiten. Denn Jodoform z. B. hemmt die Entwickelung sowohl der Staphylo- als auch der Streptokokken und doch wird deshalb Niemand diese beiden Mikroorganismen als identisch bezeichnen.

---

1) l. c. p. 133.

Ad 9) Es kommt in der That vor, daß das Fieber bei einem und demselben Kranken seinen Typus wechselt, ohne daß eine Neuinfektion stattgefunden hätte. Das erklärt sich aber ungezwungen durch das gleichzeitige Vorhandensein von 2 oder 3 Parasitengenerationen derselben Art oder in selteneren Fällen durch Mischinfektion. So sehen wir es recht häufig, daß Jemand, der an einem Quotidianfieber gelitten hat, später, ohne daß er einer Neuinfektion ausgesetzt gewesen wäre, einen Rückfall in Gestalt eines Tertian- oder Quartanfiebers bekommt. Dann sind eben das erste Mal 2 Generationen von Tertianparasiten und das zweite Mal 3 Generationen von Quartanparasiten im Blute gewesen. Davon ist im ersten Falle 1 Generation, im zweiten Falle sind aber 2 Generationen steril geworden. Dann muß natürlich ein Typuswechsel des Fiebers eintreten. Manchmal beobachtet man diesen Typuswechsel schon während der Erkrankung. Namentlich häufig wird aus einem Quotidianfieber ein Quartanfieber. Darauf hat in jüngster Zeit wieder Brahmachari[1]) hingewiesen. Ebenso kann natürlich das Umgekehrte stattfinden, d. h. aus einem Quartanfieber ein Quotidianfieber werden, wenn von den 3 im Blute vorhandenen Parasitengenerationen 2 anfänglich zu schwach an Zahl waren, um Anfälle hervorzurufen und dies erst nach entsprechender Vermehrung thun.

Aber auch im zweiten Falle (d. h. bei Mischinfektionen) handelt es sich nicht um eine bloße Annahme, sondern um Thatsachen. Auch hier können wir mit Hilfe des Mikroskopes die Ursachen des Wechsels des Fiebertypus nachweisen. Wir finden nämlich in solchen Fällen nicht verschiedene Generationen derselben Malariaparasitenart, sondern verschiedene Malariaparasitenarten nebeneinander. Welche Parasitenart allerdings schließlich die Oberhand gewinnen und das klinische Bild beherrschen wird, läßt sich von vornherein nicht bestimmen. Wir wissen aber aus den Versuchen di Mattei's, daß ein Quartanfieber, auf das Tropenfieberparasiten geimpft werden, aufhören kann; daß die Quartanparasiten von den wenigen eingeimpften Tropenfieberparasiten vollständig verdrängt werden können und daß dann an Stelle des ursprünglichen Quartanfiebers ein Tropenfieber tritt.

Aus dem Gesagten geht also hervor, daß die neusten Forschungen die Annahme der Einheitlichkeit des Malariaparasiten definitiv widerlegt haben, und zwar sind es nicht nur die epidemiologischen, sondern auch die parasitologischen Forschungen mit ihrer verbesserten Technik gewesen, die das bedingt haben. Hervorzuheben ist, daß die sich immer mehr einbürgernde Untersuchung der Malariaparasiten im gefärbten Präparat wesentlich dazu beigetragen hat, die morphologischen Unterschiede zwischen den einzelnen Parasitenarten, die bei der Untersuchung im frischen Präparat nicht so deutlich hervortreten, unvergleichlich viel deutlicher und überzeugender zu machen.

Vor allen Dingen aber hat die Erkenntnis der Thatsache, daß die viel umstrittenen Halbmonde Gameten sind, dazu beigetragen, die Annahme von der Einheitlichkeit der Malariaparasiten unhaltbar zu machen. Wir wissen zwar noch nicht, wie bereits gesagt, auf welche Weise sowohl die Halbmonde als auch die Gameten der großen Parasitenarten aus den Jugendformen dieser Parasitenarten hervorgehen, wir wissen aber mit Bestimmtheit, daß es der Fall ist.

---

1) Indian. Med. Gaz. 1902. p. 93.

B. Die Entwicklung der Tertiangameten.

Im Nachfolgenden soll nun der Versuch gemacht werden, die Entwickelung der Gameten der Tertianparasiten klar zu legen. Eingehendere Untersuchungen über die Entwickelung von Gameten sind meines Wissens zum ersten Male von Stephens und Christophers[1]) gemacht worden. Diese Autoren machten ihre Untersuchungen an Negerkindern der westafrikanischen Küste und suchten nur den Entwickelungsgang der Gameten des Tropenfieberparasiten klar zu legen. Ihre Untersuchungen wurden an gefärbten Präparaten gemacht.

Nachdem die Autoren angegeben haben, daß im Blute von Negerkindern die erwachsenen Gameten des Tropenfieberparasiten nicht in der bekannten Form der Halbmonde, sondern in Formen erscheinen, die denjenigen der Quartanparasiten ähneln, geben sie eine genauere Beurteilung dieser eigenartigen Gameten.



Gameten des Tropenfieberparasiten im Blute von Negerkindern. (Nach Stephens und Christophers.)
1 Jugendform des Gameten, 2—4 ältere Formen, 5 Makrogamet, 6 Mikrogametocyt, 7 und 8 Makrogameten, die in getüpfelten roten Blutkörperchen liegen.

Der erwachsene männliche Gamet (Mikrogametocyt) hat bräunliches Pigment, das in seinem Centrum angehäuft ist oder in Gestalt eines breiten Bandes quer durch seine Mitte zieht. An seiner Peripherie finden sich 12—20 stark gefärbte, dreieckige Körperchen (Chromosomen).

Der erwachsene weibliche Gamet (Makrogamet) hat schwarzes Pigment, das unregelmäßig über den ganzen Parasiten zerstreut ist. Der Gamet ist gleichmäßig, aber nur schwach gefärbt oder zeigt höchstens ein oder zwei stärker gefärbte Partikelchen. Oefter findet man in ihm einen oder zwei vakuolenartige Räume.

Die Thatsache, daß der Mikrogametocyt stets eine central gelegene Pigmentmasse und an der Peripherie gelegene Chromosomen aufweist, erinnert an die Form eines ungeschlechtlichen Parasiten (Schizonten), der sich zur Teilung anschickt.

Für gewöhnlich übertreffen die männlichen Gameten die weiblichen an Zahl. Findet man keine männlichen Gameten, so ist das eine Ausnahme. In den von Stephens und Christophers untersuchten

1) Reports to the Malaria Com. Royal. Society. Third Series. 1900. p. 5.

Fällen stellte sich das Verhältnis der erwachsenen männlichen zu den erwachsenen weiblichen Gameten wie folgt:

Fall						
Fall I	männliche Gameten	♂	5	weibliche Gameten	♀	3
„ II	„ „	♂	5	„ „	♀	9
„ III	„ „	♂	2	„ „	♀	1
„ IV	„ „	♂	3	„ „	♀	4
„ V	„ „	♂	4	„ „	♀	1
„ VI	„ „	♂	13	„ „	♀	3
„ VII	„ „	♂	4	„ „	♀	1
„ VIII	„ „	♂	0	„ „	♀	2
„ IX	„ „	♂	17	„ „	♀	9
	Sa.	♂	53	Sa.	♀	33

Nach Celli kommen Jugendformen der Gameten des Tropenfieberparasiten im peripherischen Blute nur in perniziösen Fällen vor, sonst nur im Knochenmark. Die Verff. fanden sie aber regelmäßig im peripherischen Blut der untersuchten Negerkinder. Diese Jugendformen der Gameten des Tropenfieberparasiten unterscheiden sich von den entsprechenden Jugendformen der Schizonten durch ihren Pigmentgehalt. Einen Unterschied in dieser Beziehung zwischen den jüngsten Formen der Gameten und Schizonten festzustellen, ist schwer. Doch färben sich die Jugendformen der Gameten stärker und lassen manchmal schon die Anlage von Chromosomen erkennen. Sie sind etwa $^1/_3$ so groß als ein rotes Blutkörperchen, haben nicht das Ansehen von gewöhnlichen Tropenringen, entsprechen ihrer Zahl nach den Gameten, färben sich gleichmäßig in der Peripherie, haben kein Chromatinkorn[1]) und zeigen für gewöhnlich einige Pigmentkörnchen. Im frühesten Jugendstadium sind sie pigmentlos. So beschaffene Formen sind nach Ansicht von Stephens und Christophers die jüngsten Entwickelungsstadien der Gameten des Tropenfieberparasiten oder besser gesagt: Im Blute von Negerkindern sind solche Formen als die jüngsten Entwickelungsstadien der Gameten des Tropenfieberparasiten anzusehen. Sie sind ebenso wie ältere Formen dieser Art wahrscheinlich fälschlicherweise wiederholt für Tertian- und Quartanparasiten gehalten worden.

Ueber etwaige Jugendformen von Tertian- oder Quartangameten berichten die Verff. nicht, weil ihnen weder Tertian- noch Quartanfieber — mit seltensten Ausnahmen — bei ihren Untersuchungen in Westafrika zu Gesicht kamen.

Es giebt aber auch beim Tertianparasiten Formen, die bisher noch nicht näher untersucht worden sind und die nach meinen Beobachtungen als die Jugendformen von Tertiangameten anzusprechen sind. Sie verhalten sich indes in den meisten Beziehungen ganz anders als die eben beschriebenen Jugendformen der Gameten des Tropenfieberparasiten.

Die Resultate meiner Untersuchungen, die ich im Folgenden mitteile, beziehen sich lediglich auf den Tertianparasiten. Nun glaube ich zwar, daß sie mit entsprechenden Abänderungen auch Geltung für die Gameten des Tropenfieber- und Quartanparasiten haben werden, kann aber diese Annahme nicht beweisen, da mir zur Durchführung dieses Beweises das nötige Untersuchungsmaterial fehlte. Ich wiederhole also ausdrücklich, daß die folgenden Ausführungen nur Geltung für den Tertianparasiten haben.

1) Vom Verf. hervorgehoben, im Urtext nicht.

Im allgemeinen ist zunächst zu bemerken, daß auch die Jugendformen der Tertiangameten Chromatin haben. Ich glaube übrigens, daß dies auch beim Tropenfieberparasiten der Fall ist. Denn eine Zelle ohne Kernsubstanz ist nicht entwicklungsfähig. Stephens und Christophers werden das Chromatin bei den Jugendformen der Gameten des Tropenfieberparasiten deshalb vermißt haben, weil es sich mit ihrer Färbemethode nicht darstellen ließ[1]). Es giebt nun zwar auch einzelne Jugendformen der Gameten des Tertianparasiten, in denen das Chromatin fast fehlt — und ich vermute, daß dies auch bei den Gameten des Tropenfieberparasiten vorkommen wird — solche Formen sind aber dem Untergange geweiht und können aus Mangel an Kernsubstanz sich nicht weiter entwickeln. Diese Eigenschaft ist aber nicht etwa nur einzelnen jugendlichen Gameten, sondern auch einzelnen jugendlichen Schizonten eigentümlich und kann daher nicht als etwas allein den Gameten Zukommendes angesehen werden. Solche Formen kommen aber über die Ringbildung gar nicht hinaus. Schon der Plasmaring ist geschrumpft und das übrige Plasma getrübt. Ich schließe das letztere aus dem Umstande, daß bei solchen geschrumpften Ringen die Substanz des Blutkörperchens nicht mehr durchschimmert, wie das bei den normalen Ringen der Fall ist. Die Innenfläche der geschrumpften Ringe ist weiß.

Als ich meine Untersuchungen begann, schien es mir zunächst, als ob außer der Beschaffenheit des Chromatins namentlich seine Gestalt von wesentlicher Bedeutung für die Entscheidung der Frage wäre, ob man die Jugendform eines Schizonten oder eines Gameten vor sich hat. Denn diejenigen Parasiten, deren Chromatin z. B. stäbchenförmig ist, zeigen auch sonst noch manchmal besondere Eigentümlichkeiten und es giebt außerdem erwachsene weibliche Gameten mit ausgesprochen stäbchenförmigem Chromatin. Auch wollte es scheinen, als ob die Entstehung des stäbchenförmigen Chromatins in ganz bestimmter, leicht nachweisbarer Weise vor sich ginge. Ich fand nämlich stäbchenförmiges Chromatin zunächst nur in halb- oder ganz erwachsenen Formen, während in jüngeren Formen das Chromatin als Y oder Winkel erschien. Es hatte also den Anschein, als ob sich das Chromatin bei einem Teil der Gameten derartig entwickelte, daß der ursprüngliche Chromatinkern, anstatt sich, wie das bei den Schizonten der Fall ist, beim Heranwachsen des Parasiten zu teilen, Y-Form annahm, dieses Y sich später zu einem Winkel und schließlich zu einem Stäbchen streckte.

Indes weitere Untersuchungen zeigten, daß die Form des Chromatins von vornherein gegeben ist. Wir finden nämlich bereits in den jüngsten Ringen das Chromatin nicht nur in Ypsilon- und Winkel-, sondern auch bereits in Stäbchenform, und zwar nicht nur bei Gameten, sondern auch bei Schizonten[2]). Dasselbe gilt auch für halberwachsene und erwachsene Formen der beiden Entwickelungsreihen, bei denen wir nicht nur stäbchen- und winkelförmiges, sondern auch Y-förmiges Chromatin finden. (Vergl. Tafel Fig. I, 1—6 und 1a—6c.)

Aus diesen Befunden geht also hervor, daß den Gameten eine besondere Chromatingestalt nicht eigentümlich ist. Es mußte also bei den Gameten nach anderen Merkmalen

---

1) Stephens und Christophers färbten mit Hämatin. Mit Sicherheit läßt sich das Chromatin aber nur mit der Romanowsky-Färbung darstellen.

2) Die Kornform des Chromatins wird allerdings in den Jugendformen des Tertianparasiten bei weitem am häufigsten angetroffen.

gesucht werden, die sie auch in ihrem Jugendzustand von den Schizonten unterscheiden. Weil aber beim Tertianparasiten bis jetzt nur die erwachsenen Gameten als solche anerkannt waren, so wendete ich mich deshalb zunächst dem Studium der Chromatinverhältnisse der erwachsenen Gameten zu, um dann nach rückwärts hin die Verhältnisse der Entwicklung bis zu den jüngsten Formen klar zu legen.

Da fiel es mir auf, daß, wenn man erwachsene Gameten auf zwei verschiedene Arten färbt, man Bilder erhält, die sich in sehr glücklicher Weise ergänzen. Färbt man nämlich nach Romanowsky, so kommt bekanntlich das Chromatin zur Darstellung, und zwar findet man beim männlichen Gameten (Mikrogametocyten) viel, beim weiblichen Gameten (Makrogameten) wesentlich weniger Chromatin. Bei der einfachen Methylenblaufärbung kommt aber nur das Plasma dieser Formen zur Darstellung und der Beobachter ist demgemäß gezwungen, diesem allein seine Aufmerksamkeit zuzuwenden. Und da findet sich denn, daß der männliche Gamet sehr häufig bis zuletzt (d. h. solange er noch im roten Blutkörperchen liegt) eine vollständige Ringform beibehält. Er gleicht dadurch einem außerordentlich stark und grob pigmentierten, stark vergrößerten Tertianring, bei dem Pigment sich auch in der feinen Hälfte des Ringes findet. Vergleicht man diesen Befund mit demjenigen, den man an einem nach Romanowsky gefärbten erwachsenen männlichen Gameten des Tertianparasiten erhebt, so sieht man sofort, daß der große, ungefärbte, innere Ausschnitt des Ringes, der bald oval, bald nierenförmig ist, der Stelle entspricht, an welcher das Chromatin liegt. Das Chromatin liegt also innerhalb des Plasmaringes. (Vergl. Tafel Fig. II, 1 und 1a.)

Etwas anders gestalten sich — aber ganz ähnlich — die Verhältnisse beim erwachsenen weiblichen Gameten des Tertianparasiten. Auch hier fällt uns bei der Methylenblaufärbung ein ovaler oder kreisförmiger, ungefärbter, aber kleiner Ausschnitt auf, der sich scharf aus dem blaugefärbten Plasma heraushebt, fast immer dicht an der Peripherie des Gameten liegt und an der Außenseite von einer feinen, blauen Bogenlinie überspannt ist. Auch hier ergiebt der Vergleich mit einem nach Romanowsky gefärbten, erwachsenen weiblichen Tertiangameten, daß der eben beschriebene ungefärbte Ausschnitt der Stelle entspricht, an der das Chromatin liegt und daß auch beim weiblichen Gameten das Chromatin innerhalb eines Plasmaringes, allerdings eines viel zarteren und kleineren, liegt. (Vergl. Tafel Fig. II, 2 und 2a.)

Es mußte nunmehr die Entstehung dieser Plasmaringe klar gelegt werden. Beim männlichen Gameten war dies verhältnismäßig einfach, weil dieser als erwachsenes Individuum häufig in der Form eines vergrößerten Tertianringes erscheint. Der Schluß war also leicht zu ziehen, daß kleine Tertianringe, bei denen das Chromatin innerhalb des blauen Plasmaringes liegt, als Jugendform des männlichen Gameten anzusprechen wäre. Ob aber diese Art kleiner Plasma- resp. Tertianringe auch als Jugendformen der weiblichen Tertiangameten anzusprechen sind, war zunächst direkt nicht recht wahrscheinlich, weil bei den erwachsenen weiblichen Gameten der oben beschriebenen Art das Chromatin nicht in der Mitte, sondern an der Peripherie liegt. Diese scheinbare Verschiebung des Chromatins von seiner ursprünglichen Stelle mußte also erklärt werden. Trotz und alledem mußte zunächst angenommen werden, daß auch die weiblichen

Gameten aus Ringformen hervorgehen, weil beim Tertianparasiten andere Jugendformen als Ringe nicht bekannt sind. Wenn aber auch die weiblichen Gameten aus Ringformen hervorgingen, so mußten sie ebenfalls aus solchen Ringformen hervorgehen, bei denen das Chromatin von vornherein innerhalb eines Plasmaringes liegt. Es kam eben, wie bereits gesagt, nur darauf an, zu erklären, wie die scheinbare Verschiebung des Chromatins aus der Mitte nach der Peripherie hin zustande kommt.

Dieses scheinbar eigentümliche Verhalten des Chromatins läßt sich nur aus den Wachstumsverhältnissen des Plasmas des Tertianparasiten erklären. Es ist daher notwendig, die verschiedenen Arten, auf welche das Plasma eines Tertianparasiten wachsen kann, festzustellen. Dies allein genügt aber nicht. Das Plasmawachstum muß in Verbindung mit dem Wachstum des Chromatins betrachtet werden. Da aber das Plasmawachstum bei Schizonten und Gameten in derselben Weise erfolgen kann, das Wachstum des Chromatins aber nicht, so will ich zunächst die Wachstumsverhältnisse des Plasmas beim Tertianparasiten behandeln und dann entwickeln, welche Parasitenformen zustande kommen, wenn man in das bei beiden Entwicklungsreihen (d. h. Schizonten und Gameten) gleichartige Plasmawachstum die beiden verschiedenen Wachstumsarten des Chromatins einfügt.

Wenn ich das Plasmawachstum bei Schizonten und Gameten soeben als gleichartig bezeichnet habe, so ist das nicht ganz richtig. Es kann zwar das Plasma bei beiden Entwicklungsreihen auf die sofort zu beschreibenden Arten wachsen, indes die Schizonten sowohl als auch die Gameten wachsen in Bezug auf ihr Plasma sich gern in bestimmten Formen aus, d. h. die Schizonten sowohl als auch die Gameten bevorzugen bestimmte Wachstumsformen. So tritt z. B. jenes Plasmawachstum, durch das der halberwachsene Tertianparasit einer Amöbe gleicht, die in dem Augenblick, als sie alle ihre Fortsätze ausstreckte, erstarrte, fast nur ausschließlich bei Schizonten und nur in seltenen Fällen bei Gameten auf. Ja, Gameten wachsen so selten in diesen Formen, daß diese bei der folgenden Besprechung gar nicht weiter besonders aufgeführt worden sind. Die Gameten haben vielmehr die Neigung, ruhige, starre, wenig gegliederte Plasmaformen zu bilden.

Nach meinen Untersuchungen kommen beim Tertianparasiten drei Hauptwuchsformen des Plasmas in Betracht.

1) Der kleine Tertianring wächst als solcher, d. h. der ursprüngliche Ring verändert seine Form nicht wesentlich, sondern nimmt nur an Größe zu. Diese Art des Wachstums ist den anderen Wachstumsarten gegenüber verhältnismäßig selten. Sie findet sich hauptsächlich bei den männlichen Gameten. (Vergl. Tafel Fig. IX.)

2) Der kleine Tertianring wächst hauptsächlich von der äußeren Umrandung der mondsichelförmigen Verdickung aus. Dabei kann

a) die haarfeine Hälfte des ursprünglichen Ringes mehr oder weniger stark im Wachstum zurückbleiben. Wächst die haarfeine Hälfte des Ringes so gut wie gar nicht mit — was selten ist — und überwiegt das Wachstum von der äußeren Umrandung der mondsichelförmigen Verdickung bedeutend, so erscheint die haarfeine Hälfte des Ringes schließlich als kleines Anhängsel einer großen blauen Plasmafläche, das von dieser allmählich gegen die Peripherie des roten Blutkörperchens gedrängt wird. (Vergl. Tafel Fig. III.) Oder aber

b) Die haarfeine Hälfte des ursprünglichen Tertianringes zeigt eine

stärkere Wachstumsenergie: sie wächst bis zu einem gewissen Grade mit. Dann aber machen sich im Plasmawachstum gewisse Unterschiede geltend, die schon oben angedeutet wurden. Während die Schizonten mit Vorliebe in der phantastischen amöboiden Form wachsen und bei dieser Wachstumsart der ursprüngliche kleine Tertianring sehr bald zu Grunde geht, wächst unter Erhaltung der haarfeinen Hälfte des ursprünglichen Tertianringes das Plasma bei den Gameten fast ausschließlich in starren, wenig gegliederten Formen und hat Neigung, viereckig oder quadratisch zu werden. (Vergl. Tafel Fig. V, 1 und Fig. X, 6.) Diese Plasmaform behalten die Gameten bis zur völligen Reifung, d. h. solange sie noch innerhalb des roten Blutkörperchens liegen, bei. In diesen Fällen, die wohl als die Hauptwachstumsform der Gameten bezeichnet werden können, umwächst das Plasma allmählich den ursprünglichen Tertianring, seine haarfeine Hälfte, die allmählich an Ausdehnung und Stärke etwas zugenommen hat, immer mehr gegen die Peripherie des roten Blutkörperchens drängend. Dadurch aber, daß das Plasmawachstum von der mondsichelförmigen Verdickung aus auch jetzt noch die Wachstumsenergie der haarfeinen Hälfte des Ringes ganz erheblich überwiegt, bleibt auch hier die haarfeine Hälfte ein Anhängsel, das sich schließlich an der Peripherie des erwachsenen Gameten findet. Bleibt die haarfeine Hälfte des ursprünglichen Ringes bis zuletzt erhalten, so wird seine Innenfläche zur achromatischen Zone, die sich dann namentlich in Methylenblaupräparaten ganz besonders schön in Gestalt eines scharfgeschnittenen Ovals oder Kreises aus dem blauen Plasmaleib heraushebt. Auch in zartgefärbten Romanowsky-Präparaten ist sie an manchen Exemplaren noch gut zu erkennen.

Aber die haarfeine Hälfte des ursprünglichen Tertianringes bleibt nicht immer bis zuletzt erhalten. In welcher Weise sie zu Grunde geht, wird sofort erläutert werden. Indeß das späte Verschwinden der haarfeinen Hälfte verändert das Aussehen des erwachsenen Gameten nicht wesentlich, während es bei den $^3/_4$-erwachsenen Gameten auffällige Erscheinungen hervorruft.

3) Es können beide Hälften des Tertianringes Flächenwachstum zeigen. Diese Formen zeigen die größten Verschiedenheiten und bei ihnen ist es recht schwer festzustellen, ob man einen Schizonten oder Gameten vor sich hat, wenn die Parasiten noch nicht oder doch wenigstens noch nicht ganz erwachsen sind. Auch hier überwiegt die Wachstumsenergie der ursprünglich mondsichelförmig verdickten Hälfte des kleinen Tertianringes. Diese Formen zeichnen sich schon in den frühesten Jugendstadien durch eine außerordentlich starke Blaufärbung ihres Plasmas aus, die auch den erwachsenen Parasiten noch eigentümlich ist. (Vergl. Tafel Fig. VII.)

Das wären die Hauptwachstumsarten des Plasmas. Können wir nun mit ihrer Hilfe die scheinbare Verschiebung des Chromatins, die wir bei weiblichen Gameten fanden, erklären? Ich meine: ja. Die unter No. 2 angeführte Wachstumsart erklärt sie sofort. Das Plasma des Ringes wächst nur von einer Seite aus. Die andere Seite wächst so gut als gar nicht oder doch nur sehr wenig mit. Dabei bleibt die Innenfläche des ursprünglichen Tertianringes erhalten, wird aber allmählich vom Plasma umwachsen. Nur die haarfeine Hälfte des ursprünglichen Ringes bleibt frei. Dadurch aber, daß sie wenig oder gar nicht mit wächst, wird sie zu einem Anhängsel der zu einer großen Plasmafläche gewordenen mondsichelförmigen Verdickung und mit ihr die völlig er-

haltene Innenfläche des ursprünglichen Tertianringes. Denken wir uns nun also das Chromatin ursprünglich innerhalb dieser Fläche liegend, so finden wir es am Schlusse, d. h. beim erwachsenen Parasiten noch eben da. Das Chromatin ist also wohl in Bezug auf seine Lage zur Peripherie des Blutkörperchens, nicht aber in Bezug auf seine Lage zur Innenfläche des ursprünglichen Tertianringes verschoben worden.

Die unter No. 3 angeführte Wachstumsform erklärt uns das Entstehen von Gameten, bei denen das Chromatin in der Mitte liegt; ebenso die unter No. 1 geschilderte. Noch aber müssen jene Gametenformen in ihrer Entwickelung verfolgt werden, bei denen das Chromatin ohne achromatische Zone, scheinbar vom Gameten abgetrennt, für sich allein liegt. Um die Entstehung dieser Formen klarlegen zu können, ist es aber nötig, erst die verschiedenen Wachstumsformen des Chromatins zu verfolgen.

Wie bereits oben gesagt, kann das Chromatin bei den Jugendformen des Tertianparasiten als Korn, Winkel oder Stäbchen auftreten. Diese Chromatinfiguren sind sowohl Schizonten als auch Gameten eigentümlich. Die beiden Entwicklungsreihen weisen aber ein verschiedenes Wachstum ihres vielgestaltigen Chromatins auf. Wie bekannt, ist die Kornform des Chromatins die häufigste. Beim Heranwachsen eines Schizonten ändert das in ihm gelagerte Chromatin seine Form zunächst nur unbedeutend. Es nimmt wohl an Größe zu, aber im Verhältnis zum Plasma nur wenig. Dabei bleibt es ein kompaktes Oval oder nimmt Rhombusform an. Manchmal erscheint es auch in Gestalt eines unregelmäßig begrenzten Vielecks. Trat es aber in Stäbchen- oder Winkelform auf, so behält es diese Form zunächst bei. Erst wenn die Teilung des Chromatins beginnt, schnüren sich in rascher Aufeinanderfolge von dem ursprünglichen Korn neue Teile ab, die sich wieder teilen. Das Chromatin nimmt dann zwar ungeheuer schnell an Menge zu, aber die einzelnen Chromatinstückchen erscheinen fast immer in Form von Drei- und Vielecken oder von Ovalen. Nur in seltenen Fällen als kurze Bänder, kleine Winkel oder Y-ähnliche Figuren. Die kurzen Bänder treten aber nie in der Einzahl auf. Auch durchsetzen sie nie den ganzen Parasiten, sondern erreichen höchstens die Hälfte des Durchmessers desselben.

Anders gestalten sich die Wachstumsverhältnisse bei demjenigen Chromatin, das innerhalb des Tertianringes und scheinbar ohne Verbindung mit diesem liegt. Hier erscheint das Chromatin zwar auch gewöhnlich in Form eines scharf begrenzten, ovalen, kompakten Kornes, indes dies Korn teilt sich weder beim Heranwachsen noch im gereiften Parasiten. Es nimmt zwar beim Heranwachsen des Parasiten an Volumen zu, lockert sich manchmal schon in 24 Stunden alten Individuen auf, diese Auflockerung nimmt mit der Zeit auch erheblich zu, so daß das Chromatin bereits in 36 Stunden alten Parasiten in staubfeine Körnchen zerfallen sein kann, es bleibt aber dabei stets ein einheitliches Ganzes. Dasselbe gilt für das in Y-, Winkel- oder Stäbchenform auftretende Chromatin, wenn es innerhalb des Plasmaringes gelegen ist. Hier werden die Chromatinfiguren durch ihre Auflockerung manchmal in ihrer Form wesentlich verändert. Sie bleiben aber auch bei diesen Formen ein einheitliches Ganzes. So kommt es vor, daß das in Winkelform erscheinende Chromatin durch die Auflockerung zum Dreieck wird, weil der Raum zwischen den Winkelschenkeln sich mit Chromatinkörnchen füllt und die Y-Form geht durch die Auflockerung vollständig verloren. Am leichtesten bleibt die Stäbchenform erhalten. Das Stäb-

chen wird allerdings durch die Auflockerung zum mehr oder weniger schmalen Bande, das Einkerbungen und Hervorwölbungen zeigt.

Die Auflockerung des Chromatins kann natürlich verschiedene Grade annehmen. Bald ist das aufgelockerte Korn nur wenig größer als das ursprüngliche, bald ist es doppelt, ja! zehnfach so groß und in eine große Anzahl deutlich von einander getrennter feinster Körnchen zerfallen. Dieser Zerfall in feinste Körnchen, der bei allen Arten von Chromatinfiguren beobachtet werden kann, ist färberisch nicht immer mit der gleichen Deutlichkeit darzustellen. In manchen Fällen tritt die genannte Erscheinung sehr klar und regelmäßig auf, in anderen ist sie nur an vereinzelten Individuen festzustellen.

Auch kann das aufgelockerte Chromatinkorn genau dieselben Formen wie beim Schizonten annehmen, d. h. es kann als unregelmäßiges Vieleck oder als Rhombus erscheinen. Häufig wird es auch in Sichelform angetroffen. Es hat sich dann dem Plasmaringe in seiner Form angepaßt. Umgekehrt kann es aber, wenn es in Stäbchenform auftritt, trotz seiner Auflockerung den umschließenden Plasmaring in die Länge dehnen, ja sogar sprengen.

Warum es aber in dem einen Falle die Innenfläche des ursprünglichen Tertianringes (achromatische Zone) derartig ausfüllt, daß bei der Romanowsky-Färbung nichts mehr von ihr zu sehen ist und warum in anderen Fällen trotz der Größe des aufgelockerten Chromatinkornes eine deutliche ringförmige achromatische Zone vorhanden ist, läßt sich nicht sagen.

Wenn wir nun die eben beschriebene Wachstumsart des ursprünglich innerhalb des kleinen Tertianringes liegenden Chromatins mit den oben angegebenen 3 Hauptwachstumsformen des Plasmas kombinieren. so muß es gelingen, eine lückenlose Entwickelungsreihe der Tertiangameten aufzustellen, wenn anders die Annahme richtig ist, daß diejenigen kleinen Tertianringe, bei denen das Chromatin innerhalb des Plasmaringes liegt, die Jugendformen der Tertiangameten sind.

Ich lasse die Entwickelungsreihen der Gameten in 3 Abteilungen, entsprechend dem Plasmawachstum, folgen.

1) Wenn der Ring als solcher wächst, so hat das Chromatin genügend Platz, sich auszudehnen. Ob es dabei ursprünglich in Stäbchen-, Winkel- oder Kornform erschien, ist gleichgiltig. Es lockert sich allmählich auf und füllt den Innenraum des Ringes mehr oder weniger aus, ohne sich zu teilen. Mitunter behält es dabei seine ursprüngliche Form bis zur völligen Reife des Gameten bei. Da wir nun die männlichen Gameten viel öfter in Ringform antreffen als die weiblichen, so können wir wohl mit einem gewissen Grade von Wahrscheinlichkeit annehmen, daß jene großen Tertianringe, die ihr Chromatin innerhalb des Ringes liegen haben und sich durch eine gewisse Starrheit ihres Plasmas auszeichnen, die halberwachsenen männlichen Gameten sind. Wir können diese Behauptung aber nicht beweisen. Denn allen jenen Ringen fehlt die charakteristische Plasmafärbung, die die erwachsenen männlichen Gameten sofort erkennen läßt. Wir können die eben beschriebenen Ringe wohl mit Sicherheit als Gameten betrachten, wir können aber nicht sagen, ob es sich um männliche oder weibliche Individuen handelt.

Die Figurenreihe IX der Tafel giebt den Entwickelungsgang dieser Wachstumsart wieder.

2) Wenn der Parasit hauptsächlich von der Außenseite der halbmondsichelförmigen Verdickung her wächst und

a) der haarfeine Teil des Ringes sowie das vom Ring umschlossene Chromatin nur wenig wachsen, so bleibt der Ring auch im reifen Gameten noch erhalten, seine Innenfläche wird zur achromatischen Zone und in dieser liegt dann das zwar kleine, aber aufgelockerte Chromatinkorn. Durch das einseitige Wachstum des Plasmas erfolgt dann die oben bereits erklärte scheinbare Verschiebung des Chromatins an die Peripherie des Gameten. Wächst der haarfeine Teil des Ringes etwas mit, so wird die achromatische Zone, die in diesen Formen besonders schön bei Methylenblaufärbung hervortritt, nur etwas größer. Das Chromatin lockert sich stärker auf oder besser gesagt, weil das Chromatin sich stärker auflockert und stärkere Wachstumsenergie zeigt, wird der ursprünglich kleine Tertianring mehr ausgedehnt. Auch in einem solchen Falle kann seine haarfeine Hälfte bis zur völligen Reifung erhalten bleiben oder sie verschwindet erst kurz vor derselben. Im letzteren Falle ist dann aber stets noch ein scharfer halbkreisförmiger Ausschnitt an der Peripherie des erwachsenen Gameten erhalten, in dem das Chromatin liegt und der deutlich erkennen läßt, daß er der Innenfläche des ehemaligen kleinen Tertianringes entspricht.

In der eben beschriebenen Art, die sich außerdem durch viereckiges oder rechteckiges Plasma auszeichnet, wachsen mit Vorliebe die weiblichen Gameten.

b) Entfaltet das Chromatin bei dieser Wachstumsform des Plasmas eine besondere Wachstumsenergie — und das findet sich am meisten beim stäbchenförmigen Chromatin — so sprengt dieses verhältnismäßig schon früh den ursprünglichen Tertianring. Die haarfeine Hälfte des Ringes zerreißt, seine Reste legen sich an die Hauptplasmamasse, die hier gern in Form eines Rechtecks erscheint, an und das mehr oder weniger stark aufgelockerte Chromatin liegt dann als Stäbchen oder Band scheinbar ohne Verbindung mit dem Plasma neben diesem. Erst kurz vor der Reifung des Gameten wird es von dem heranwachsendem Plasma wieder erreicht und liegt dann an der Peripherie des Gameten. Die achromatische Zone fehlt bei diesen Formen.

Auch diese Wachstumsart findet sich meistens bei weiblichen Gameten.

Diese beiden unter No. 2 beschriebenen Wachstumsformen werden am häufigsten angetroffen und zwar 2^a bei weitem häufiger als 2^b.

3) Wenn der ursprüngliche Tertianring von beiden Hälften aus Flächenwachstum zeigt, so wird das Chromatinkorn sehr bald dicht an diesen Flächen, die meist auffallend dunkelblau gefärbt sind, eingeschlossen und bleibt trotz seiner Auflockerung klein. Die achromatische Zone geht fast regelmäßig verloren. In diesem Falle liegt dann das Chromatin auch beim erwachsenen Gameten in der Mitte. Diese Wachstumsform ist beiden Gametengeschlechtern ungefähr gleich häufig eigentümlich, aber seltener als die unter No. 2 aufgeführte. (Vergl. Tafel Fig. VII.)

Es giebt nun noch eine vierte Entwicklungsart der Gameten, von der ich bisher nicht gesprochen habe, weil sie selten und es mir nicht mit Sicherheit gelungen ist, sie ganz zu verfolgen. Es giebt nämlich halb und ganz erwachsene Parasiten, bei denen ein kleines aufgelockertes Chromatinkorn außerhalb eines großen ungegliederten Plasmaleibes liegt oder diesen gerade eben noch berührt. Es fehlt fast immer jede Andeutung einer achromatischen Zone und da in diesen vermeintlichen Gametenformen das Chromatinkorn immer auffallend klein ist, kann nicht angenommen werden, daß es innerhalb eines Plasmaringes lag und diesen bei seinem Wachstum sprengte. Wir müssen uns also nach einer

anderen Jugendform umsehen, als die bisher beschriebenen es waren. Und da giebt es denn in der That Jugendformen des Tertianparasiten, die den eben beschriebenen erwachsenen Gameten entsprechen. Man findet nämlich junge Parasiten, bei denen das Chromatin scheinbar ohne jede Verbindung mit dem als kleiner Bogen erscheinenden Plasma für sich allein liegt. Nun könnte eingewendet werden, daß diese Form ein Vorstadium der Ringform wäre. Indes ich glaube das nicht, weil man schon in den Teilungsfiguren der Schizonten die im Entstehen begriffenen jungen Parasiten als ausgesprochene Ringformen findet und somit eine Jugendform, wie sie eben in Rede steht nicht als Vorstufe der Ringform angesehen werden kann.

Da nun bei den halberwachsenen Gameten dieser Art das Chromatin fast ebenso liegen kann wie bei den Schizonten, so muß man den ganzen Habitus dieser Gebilde in's Auge fassen, wenn man eine Differentialdiagnose stellen will. Sicher kann man das erst, wenn das fragliche Gebilde fast die Größe eines normalen Blutkörperchens erreicht hat und immer noch nur ein Chromatinkorn besitzt. In diesem Falle haben wir sicher einen Gameten vor uns, da ein Schizont von dieser Größe bereits in der Chromatinteilung begriffen ist. Nicht zu erkennen sind solche Formen in schlecht ausgestrichenen Präparaten. (Vergl. Tafel Fig. VIII.)

Wenngleich sich nun die Entwicklung der Gameten mit Hilfe der oben angegebenen Merkmale verfolgen läßt, so läßt sich mit Sicherheit eine Unterscheidung zwischen halberwachsenen Gameten in männliche und weibliche Individuen doch nicht durchführen. Es läge ja sehr nahe, zunächst das Verhältnis des Chromatins zum Plasma und die Farbe des Pigments zur Unterscheidung heranzuziehen. Man könnte diejenigen halberwachsenen Formen, die viel Chromatin und viel grobes gelbbraunes Pigment haben, als männliche, diejenigen, die wenig Chromatin und feines schwärzliches Pigment besitzen, als weibliche ansehen. Das ist aber nicht möglich. Denn wir haben gesehen, daß erstens der Chromatingehalt der erwachsenen weiblichen Gameten ganz erheblichen Schwankungen unterworfen ist und daß zweitens die Farbe des Pigments bei den erwachsenen Gameten nicht immer typisch vorhanden ist. Da sich nun ferner bei den halberwachsenen Gameten nie jene charakteristische graugrüne oder graurote Plasmafärbung findet, die die erwachsenen männlichen Gameten sofort als solche erkennen läßt, so habe ich Abstand davon genommen, halberwachsene Gameten in männliche und weibliche zu differenzieren.

Doch schien es mir, als ob diejenigen halberwachsenen Formen, bei denen der Parasit als starrer, ziemlich großer Ring erscheint, in dessen Innerem eine ziemliche Menge aufgelockerten Chromatins liegt, als männliche Individuen anzusprechen wären.

Weiterhin ist durchaus nicht zu leugnen, daß die Entscheidung der Frage, ob es sich um einen halberwachsenen Gameten oder um einen halberwachsenen Schizonten handelt, im gegebenen Falle recht schwierig sein kann. Irrtümer oder Zweifel können namentlich dann entstehen, wenn ein Schizont und ein Gamet in einem Blutkörperchen zusammenliegen und zur Reife gekommen sind. Das kommt zwar selten vor, wird aber doch hin und wieder beobachtet. (Vergl. Tafel Fig. XI.)

Ein solcher Fall ruft deshalb berechtigte Zweifel hervor, weil man nun die Chromatinentwickelung der Schizonten und Gameten scheinbar in einem Parasiten zusammenfindet. Ein solcher Befund ist aber geeignet, die vorstehenden Ausführungen — betreffend Unterscheidungsmerkmale zwischen Gameten und Schizonten — hinfällig zu machen und

muß deshalb erwähnt und erläutert werden. In der Figur XI finden wir den Gameten mit seinem aufgelockerten Chromatin in der Mitte liegen. Er ist vom Schizonten, dessen Chromatin sich bereits in lebhafter Teilung befindet, umlagert.

Ein solcher Befund steht übrigens nicht ohne Analogie da. Auch beim Proteosoma findet man derartige Vorkommnisse und zwar häufiger als beim Tertianparasiten. Da nun beim Proteosoma die Parasitenformen starrer und fester als beim Tertianparasiten sind und sich infolgedessen nicht an einander anpassen, so ist beim Proteosoma ein solches Bild leichter zu entziffern.

Bisher habe ich nur von morphologischen Unterscheidungsmerkmalen gesprochen. Es sind aber noch einige andere Thatsachen vorhanden, die dafür sprechen, daß es sich bei den von mir als junge und jüngste Gameten angesprochene Formen thatsächlich um solche handelt. Es ist bekannt, daß man Tertianringe, bei denen das Chromatinkorn innerhalb des Plasmaringes liegt, verhältnismäßig selten antrifft. Sie treten aber zahlreich in Fällen auf, in denen zahlreiche erwachsene Gameten, die ja mit nichts Anderem zu verwechseln sind, vorhanden sind.

Es kommt fernerhin dazu, daß sich die eben genannten Tertianringe und die erwachsenen Gameten in ganz bestimmter Weise ergänzen. Erwachsene Gameten findet man, wie bekannt, bei einem Tertianfieber in allen Fieberstadien und da diese Formen durch ihre Größe und Eigenartigkeit ebenso auffallen wie die Teilungsformen der Schizonten, so werden sie ebensowenig wie diese übersehen und scheinen daher bei flüchtiger Betrachtung häufiger vorhanden zu sein, als sie es wirklich sind. Das findet man sehr bald heraus, wenn man ihr Verhältnis zur Gesamtzahl der Parasiten in den verschiedenen Fieberstadien zahlenmäßig festlegt. Da macht man die eigentümliche Beobachtung, daß ihre Anzahl in den verschiedenen Fieberstadien ganz erheblichen Schwankungen unterworfen ist und daß diese Schwankungen in einer ganz regelmäßigen Weise stattfinden. Das läßt sich deutlich aus den im Nachfolgenden mitgeteilten Fällen erkennen. Obgleich das Material nur gering und nicht durchgängig von demselben Gesichtspunkt aus gesammelt ist, weil es zum Teil von früheren Untersuchungen stammt, so sind doch die Schwankungen in der Anzahl der Gameten unverkennbar. Beweisend für die in Rede stehende Frage sind natürlich nur die einfachen Tertianfieber. Ich habe die doppelten Tertianfieber aber mit angereiht, weil das Verhältnis von Schizonten zu Gameten überhaupt später auch noch erörtert werden soll.

Erklärung der Zeichen.

Schizont ○ = kleiner Tertianring = ⊙ Gamet
" ■ = halberwachsener Tertianparasit = □ halberwachsener Gamet
" █ = erwachsener " = ☐ ¾- " "
" ⁘ = Teilungsform des Tertianparasiten { ♀ erwachsener weiblicher Gamet; ♂ " männlicher "

Fall I. Tertiana simpl. N. Beginn des Anfalles 8 h. a. m.

	Schizonten				Gameten				
Parasitenformen in Prozenten	○	■	█	⁘	⊙	□	☐	♀	♂
Alter der Parasiten: 48 Stunden	—	—	75		—	—	—	20,2	4,8
" " " : 24 "	—	—	—		—	15	—	5	—

Im Anfall (48 St. alt) war das Verhältnis von ♀ : ♂ = 68 : 32, 24 Stunden später war die Anzahl der Gameten zu gering, als daß das Verhältnis zwischen ♀ und ♂ hätte festgestellt werden können, da zu einer solchen Untersuchung wenigstens 100 Gameten gezählt werden müssen.

	Schizonten				Gameten					
Parasitenformen in Prozenten	○	■	■ (groß)	⁘	⊙	□	□ (groß)	♀	♂	
Fall II. Tertiana simpl. N.										
Alter der Parasiten: 12 Stunden	77	—	—	—	10	—	—	12	1	♀:♂ wegen Spärlichkeit der Gameten nicht zu bestimmen.
" " " : 24 "	—	83	—	—	—	14	—	2	1	
Fall III. Tertiana simpl. R.										
Alter der Parasiten: Beginn des Anfalles	—	—	70		—	—	—	28	2	Parasiten so spärlich, daß nur mit Mühe 200 Stück pro Präparat gezählt werden konnten.
" " " : 6 St. nach Beginn des Anfalles	—	—	73		—	—	—	27	—	
" " " : 12 Stunden	73,5	—	—	—	20,5	—	—	1,5	0,5	
" " " : 24 "	—	76,5	—	—	—	21,5	—	2	—	
" " " : 36 "	—	76,0	—	—	—	21	—	3	—	
" " " : 44 "	—	—	75		—	—	6	14	5	
Fall IV. Tertiana simpl. R.										Parasiten mäßig zahlreich
Alter der Parasiten: 3 St. nach Beginn des Anfalles	60	—	—	—	8	—	—	30	2	♀:♂ = 75:5
" " " : 12 Stunden	59	—	—	—	22	—	—	19	—	♀:♂ = 41:0
" " " : 28 "	—	50	—	—	—	41	—	8	1	♀:♂ = 94:6
" " " : 36 "	—	48	—	—	—	44	—	8	—	♀:♂ = 91:9
Fall V. Tertiana simpl. R.										
Alter der Parasiten: 7 Stunden	48	—	—	—	—	—	—	49	2	Blutausstrich zu klein. Es fanden sich nicht 100 Gameten.
" " " : 34 "	—	44	—	—	—	36	—	16	4	♀:♂ = 81:19
" " " : 43 "	—	—	46	—	—	—	31	13	10	♀:♂ = 67:33 Parasiten mäßig zahlreich.
Fall VI. Tertiana simpl. R.										
Alter der Parasiten: Fieberbeginn	—	—	30	24	—	—	4	41	1	♀:♂ = 96:6
" " " : 4 Stunden	—	—	56,5		—	—	12,5	30,5	0,5	♀:♂ = 100:2
" " " : 18 "	—	58	—	—	—	39	—	3	—	Gameten nur vereinzelt.
Fall VII. Tertiana simpl. R.										
Alter der Parasiten: 6 Stunden	66	—	—	—	20	—	—	11	2	
" " " : 17 "	65	—	—	—	21	—	—	4	10	♀:♂ = 52:48
" " " : 35 "	—	70	—	—	—	—	19	7	4	
Fall VIII. Tertiana dpl. R.										
Alter der Parasiten: Fieberbeginn	22		25		8	26		8	1	♀:♂ = 100:3
Fall IX. Tertiana dpl. R.										
6 Stunden nach einem Anfall	5	45		—	2	43		5	—	
8 " " " "	47	7	—	—	—	45		1	—	♀:♂ = 98:2
Fall X. Tertiana dpl. R.										
Im Fieberbeginn	8	—	56		2	—	28	5	1	
5 Stunden nach einem Anfall	31,5		28,5		7	—	12	18	3	♀:♂ = 43:7
10 " " " "	22,5		34		2,5	—	35,5	4	1,5	♀:♂ = 38:12

Aus den vorstehend aufgeführten Fällen geht deutlich hervor, daß die Anzahl der erwachsenen Gameten in den bestimmten Fieberstadien ganz bestimmten Schwankungen unterworfen ist. Während sie im Beginn des Fieberanfalles und auch noch 6 Stunden später verhältnismäßig zahlreich vorhanden sein können, fällt ihre Anzahl schon 12 Stunden nach dem Beginn des Anfalles ganz erheblich und kann nach weiteren 12 Stunden unter Umständen nur noch den 14. Teil ihrer ursprünglichen Menge betragen. Aus diesem eigentümlichen Verhalten muß man also den Schluß ziehen, daß bei jedem Anfall der größte

Teil der Gameten zerstört wird. Kurz vor resp. im Beginn eines zweiten Anfalles findet man aber etwa ebensoviel erwachsene Gameten wieder, wie vor Beginn des ersten Anfalles. Es müssen also in der Zwischenzeit wieder neue Gameten gebildet worden sein.

Zählt man nun 12 oder 24 Stunden nach einem Anfall die kleinen Tertianringe, bei denen das Chromatin innerhalb des Plasmaringes liegt resp. die vordem als halberwachsene Gameten geschilderten Formen als Gameten den wenigen erwachsenen Gameten zu, so erhält man fast ebenso viel Gameten als im Beginn eines Anfalles gefunden wurden. Dasselbe ist der Fall, wenn man 30 oder 40 Stunden nach dem Anfall seine Zählungen in entsprechender Weise macht, d. h. die als fast erwachsene Gameten, geschilderten Formen als wirkliche Gameten ansieht und zu den wenigen erwachsenen Gameten, die um diese Zeit vorhanden sind, hinzurechnet. Ein solches Ergebnis spricht aber sehr dafür, daß wir es bei den als junge, halb- und fast völlig erwachsene Gameten geschilderten Formen in der That mit Gameten zu thun haben.

Wenn wir das bisher Gesagte noch einmal kurz zusammenfassen, so haben wir folgende Punkte:

1) Für die Unterscheidung zwischen Gameten und Schizonten ist nicht die Art des Plasmawachstums oder die Form des Chromatins, sondern die Lage und die Wachstumsart des Chromatins entscheidend. Diejenigen Tertianparasiten, bei denen das Chromatin innerhalb eines Plasmaringes und nicht im Plasma selbst liegt, sind als Gameten anzusehen.

2) Das Chromatin kann in den Jugendformen der Tertiangameten als kompaktes, scharf begrenztes Korn, als desgleichen Stäbchen oder in Winkelform erscheinen, d. h. in denselben Formen, wie bei den Schizonten. Immer aber haben auch die jüngsten Formen bereits Chromatin und sind nicht etwa chromatinlos, wie die von Christophers und Stephens beschriebenen Jugendformen des Tropenfieberparasitengameten.

3) Beim Heranwachsen und Reifen des Gameten teilt sich sein Chromatin nie. Es bleibt in der großen Mehrzahl der Fälle innerhalb der vom ursprünglichen Plasmaring des jungen Parasiten umschlossenen Fläche liegen, die dann zur achromatischen Zone wird. Beim Heranwachsen lockert es sich auf und kann schließlich in eine große Anzahl staubfeiner Körnchen zerfallen, bleibt aber stets ein einheitliches Ganzes.

4) Durch das verschiedene Wachstum des Plasmas kommen ganz verschiedene Formen zustande, deren Zusammengehörigkeit nicht auf den ersten Blick zu erkennen ist. Denn das Plasma kann wachsen:

a) im ganzen, d. h. der ursprüngliche Tertianring wächst als solcher. Das wird am häufigsten bei männlichen Gameten beobachtet.

b) Das Plasma wächst vorwiegend von der äußeren Umrandung der mondsichelförmigen Verdickung des Ringes aus. Dann entstehen Gameten, die sich durch die einfache und starre Form ihres Plasmas auszeichnen. Das Plasma nimmt bei dieser Wachstumsart gern die Form eines Rechteckes oder Viereckes an, die bis zur fast völligen Reife beibehalten wird. Die achromatische Zone ist meistens sehr deutlich erhalten. Auf diese Weise wachsen vorwiegend die weiblichen Gameten.

c) Das Plasma wächst von beiden Ringhälften aus. Diese Formen sind schwer als Gameten zu erkennen. Denn die Innenfläche des ursprünglichen Tertianringes verschwindet sehr bald, so daß eine achromatische Zone meistens nicht gebildet wird.

5) Die erwachsenen Gameten beiderlei Geschlechtes haben beide

Chromatin, das bei beiden immer nur an einer[1]) Stelle sich findet: stark aufgelockert, aber ungeteilt. Beim Männchen (Mikrogametocyten) verhält sich das Plasma zum Chromatin = 1 : 1 bis 1 : 5, beim Weibchen (Makrogameten) = 1 : 8 bis 1 : 20. Das Männchen des Tertiangameten hat weder — wie das oben beschriebene Männchen des Tropenfieberparasiten — verschiedene Chromosomen noch bandförmig oder in einem Häufchen in der Mitte zusammengezogenes Pigment (Eigenschaften, die für die Teilungsformen der Schizonten aller 3 Malariaparasitenarten charakteristisch sind), sondern sein Chromatin liegt an einer Stelle in Gestalt eines Fadenknäuls, umgeben von dem außerordentlich stark pigmentierten Plasma. Da das Plasma des männlichen Tertiangameten sich so gut wie gar nicht färbt, so tritt das grobe, meist gelbbraune Pigment um so deutlicher hervor und der männliche Tertiangamet erscheint daher häufig mit einer außerordentlich stark pigmentierten, aber fast ungefärbten mondsichelförmigen Plasmamenge.

Das Weibchen des Tertiangameten ähnelt dem von Stephens und Christophers beschriebenen Weibchen des Gameten des Tropenfieberparasiten sehr viel mehr, als sich die eben beschriebenen Männchen ähneln. Auch beim Weibchen des Tertiangameten ist das schwarze Pigment in Gestalt feiner Stäbchen unregelmäßig über den ganzen Parasitenleib zerstreut. Jeder Makrogamet des Tertianparasiten hat aber nur ein Chromatinkorn oder -Band, das, mehr oder weniger stark aufgelockert in einer mehr oder weniger deutlichen achromatischen Zone liegt.

6) Durch jeden Fieberanfall wird die Hauptmenge der bis dahin gebildeten Gameten zerstört. Das erkennt man an dem fast völligen Fehlen erwachsener Gameten während der Apyrexie und an ihrem häufigen Auftreten im Fieberbeginn. Die neue Gametengeneration entwickelt sich während der Apyrexie genau so wie die neue Schizontengeneration, d. h. die Schizonten sowohl als auch die Gameten brauchen beim Tertianparasiten 48 Stunden zu ihrer Entwicklung.

II. Epidemiologisches.

Die oben angeführten 10 Fälle haben zur Lösung einer parasitologischen Frage mit beigetragen. Sie lassen sich aber auch für epidemiologische Untersuchungen verwerten.

Wir finden nämlich unter ihnen 2 Neuerkrankungen und 8 Rückfälle. Aus der Anzahl der bei Rückfällen und Neuerkrankungen aufgefundenen Gameten geht zunächst hervor, daß die Gameten bei den Rückfällen zahlreicher sind als bei den Neuerkrankungen. Während der Prozentsatz der Gameten bei den Neuerkrankungen zwischen 17 Proz. und 25 Proz. schwankt, stellt er sich bei Rückfällen auf 25 1/2 Proz. bis 56 Proz. Dabei fällt auf, daß nicht nur die Anzahl der erwachsenen Gameten in den verschiedenen Fieberstadien ganz erheblich schwankt, sondern daß auch das Verhältnis zwischen männlichen und weiblichen Gameten auffallende Veränderungen zeigt. ♀ : ♂ stellen sich von 1 : 1 bis auf 50 : 1. Fernerhin vermissen wir da, wo wir einzelne Gameten finden, das männliche Geschlecht regelmäßig.

Diese Thatsachen sind geeignet, uns einige Beobachtungen aus der Malariaepidemiologie leichter verständlich zu machen.

---

1) Eine seltene Ausnahme entsteht, wenn ein Gamet von vornherein zwei Chromatinkörner hat. Diese können dann bis zuletzt getrennt erhalten bleiben.

So ist z. B. folgender Einwurf gegen die Malaria-Mosquitolehre gemacht worden. Es ist darauf hingewiesen worden, daß bis jetzt so gut wie fast gar nichts — abgesehen von dem Beispiel der Inseln Mauritius und Réunion[1]) über das Einschleppen von Malariafiebern in bis dahin gesunde Gegenden bekannt geworden wäre. Wenn die Malaria-Mosquitolehre richtig wäre, so müßte die Einschleppung von Malariafiebern in bis dahin gesunde Gegenden öfters beobachtet werden, und das wäre bis jetzt nicht der Fall gewesen. Demgegenüber ist nun erstlich zu bemerken, daß gerade über den Punkt der Einschleppung bis jetzt so gut wie gar keine Beobachtungen vorliegen und daß zweitens solche Beobachtungen längere Zeit erfordern, wenn sie Wert haben sollen. Zweitens aber — und das zeigen uns die oben mitgeteilten Fälle — eignen sich die verschiedenen Malariafälle in sehr verschiedener Weise zur Weiterverbreitung dieser Krankheit.

Denn wir haben erstens gesehen, daß die erwachsenen Gameten — und diese allein sind fortpflanzungsfähig — in verschiedenen Fällen verschieden häufig sind: in Rückfällen zahlreicher als in Neuerkrankungen. Zweitens aber sind sie auch bei demselben Kranken in den verschiedenen Fieberstadien in sehr wechselnder Anzahl vertreten. Im Anfall finden wir sie am häufigsten, während der Apyrexie nur in seltenen Exemplaren. Also wird sich ein Anopheles, der zur Zeit des beginnenden Fiebers Blut von einem Kranken saugt, sich sehr viel eher infizieren als einer, der während der Apyrexie sticht. Aber nicht nur die Anzahl der Gameten ist großen Schwankungen unterworten, es wechselt auch das Verhältnis der beiden Gametengeschlechter zu einander. So finden wir zunächst in unseren Fällen durchgehend weniger Männchen als Weibchen. Das würde indes in gewissen Grenzen nicht in Betracht kommen, da die Männchen 4–8 Geißeln (Spermatozoën) entsenden. Wenn sich aber das Verhältnis von ♀ : ♂ auf 33 : 1 (Fall VIII) oder gar auf 50 : 1 (Fall VI) stellt, so erscheint eine Befruchtung der weiblichen Elemente doch nicht so sichergestellt, als wenn das Verhältnis von ♀ : ♂ = 1 : 1 (Fall VII) ist. Dazu kommt, daß in unseren Fällen gerade dann, wenn die erwachsenen Gameten recht selten waren, männliche Individuen überhaupt vermißt wurden.

Daß Verhältnisse der eben beschriebenen Art auf die Infektionsmöglichkeit des Anopheles einen Einfluß haben müssen, scheint mir aus den Beobachtungen hervorzugehen, die Daniels[2]) in Britisch-Central-Afrika gemacht hat. Er ließ 68 Anopheles funestus an einem malariakranken Europäer, dessen Blut bei oberflächlicher Durchmusterung gewöhnlich 5—6 Halbmonde im Präparat erkennen ließ, saugen. 11 von den Anopheles starben sehr bald. Von den überlebenden zeigten sich die einzelnen Serien sehr verschieden stark infiziert. Von denjenigen Anopheles nämlich, die

1 mal gesogen hatten, waren	26 Proz.	infiziert.
2 " " " "	46 "	
3 " " " "	62 "	
4 " " " "	66,6 "	

1) Aus jüngster Zeit liegt eine Mitteilung von Abbott vor, die dahin lautet, daß überall da im Staate Massachusetts Malariafieber häufiger vorkämen, wo während der letzten Jahre Italiener eingewandert wären (citiert nach Krumpholz). Ebenso nimmt Krumpholz an, daß jene zum Teil bereits wieder verschwindenden Malariaherde in österreichischen und ungarischen Garnisonen, in denen vor 1866 italienische Regimenter stationiert waren, durch jene italienischen Regimenter geschaffen worden sind.

2) Reports to the Malaria Com. Royal Soc. Series V. 1901. p. 41.

Dieser Versuch wurde bei einer Temperatur, die zwischen 21° und 29° C schwankte, angestellt.

Aus diesen Beobachtungen ergiebt sich also, daß trotz günstiger äußerer Verhältnisse und trotz wiederholten Saugens gametenhaltigen Blutes durchaus nicht immer eine Infektion des saugenden Anopheles und damit eine Weiterverbreitung der Malariaparasiten bedingt ist.

Einen ähnlichen Versuch wie Daniels hat van der Scheer[1]) zusammen mit van Berkelom in Holland gemacht. Er infizierte Anopheles mit Tertiangameten. Er giebt an, daß von 22 Anopheles maculip., die tertiangametenhaltiges Blut gesogen hatten, 18 infiziert wurden. Er giebt aber nicht an, wie oft und in welchem Fieberstadium die Tiere gesogen hatten oder wie zahlreich die Tertiangameten im Blute vorhanden waren. Die Temperatur schwankte während seiner Untersuchungen anfänglich zwischen 15° C und 29,5° C, späterhin zwischen 12° C und 21° C.

van der Scheer ist der Ansicht, daß eine Entwickelung der Malariaparasiten überhaupt nur in befruchtetem Anophelesweibchen vor sich geht[2]).

Das wäre also ein weiterer Umstand, der uns erklären könnte, warum in praxi die Einschleppung von Malariafiebern nicht so häufig sein muß, als theoretisch nach der Malaria-Mosquito-Lehre angenommen werden könnte.

Im Gegensatz zu denjenigen, die die Malaria-Mosquito-Lehre aus dem eben angeführten Grunde nicht anerkennen wollen, stehen nun diejenigen, die die Uebertragungsmöglichkeiten der Malariafieber allein durch die bekannten und oft beschriebenen Sichelkeime nicht für erschöpft halten, sondern einen zweiten Uebertragungsweg — und zwar auch mit Hilfe des Anopheles — für möglich erachten. Das sind diejenigen, die den rätselhaften Ross'schen Keimen (black spores) eine besondere Uebertragungsfähigkeit zuschreiben möchten.

Ich glaube an eine solche 2. Uebertragungsmöglichkeit aus folgenden Gründen nicht.

Die Ross'schen Keime (black spores) kommen nicht nur bei den menschlichen Malariaparasiten, sondern auch bei dem den menschlichen Malariaparasiten so außerordentlich nahe stehenden Vogelmalariaparasiten, Proteosoma vor, und zwar in derselben Art und Weise. Nun bin ich mir zwar wohl bewußt, daß man bei der Uebertragung von Erfahrungen, die man bei einem Mikroorganismus gemacht hat, auf einen anderen, wenn auch nahe verwandten, sehr vorsichtig sein muß. Indes die Beziehungen, die zwischen den menschlichen Malariaparasiten dem Menschen sowie Anopheles einerseits und dem Proteosoma, dem Kanarienvogel resp. Sperling, sowie Culex andererseits bestehen, sind so vollständig gleichartig, daß man annehmen darf, daß alle Beziehungen, die für die 3 erstgenannten Individuen unter sich bestehen, in entsprechender Weise auch bei den 3 Individuen der zweiten Reihe bestehen: zumal das für die wichtigsten Beziehungen bereits festgestellt ist.

---

1) Brit. Med. Journal. 1901. Vol. I, p. 200.

2) Dazu kommt, daß nach den letzten Berichten der englischen Expedition die verschiedenen *Anopheles*-Arten in verschiedener Weise für die Fortentwickelung der Malariaparasiten geeignet sind. So soll z. B. der Anopheles Rossii, der massenhaft in Bengalen vorkommt, die Malariaparasiten nur sehr wenig, hingegen der in den Duars gefundene A. *Christopheri* die Malariaparasiten sehr gut weiterentwickeln. Im ersteren Gebiet werden 7—12 Proz., im letzteren 40—72 Proz. Malariakranke gefunden. Royal Soc. Rep. to the Mal. Com. Series VI. 1902. p. 1.

So wissen wir, daß das Proteosoma genau in derselben Weise durch die Mückengattung Culex von proteosoma-kranken Kanarienvögeln und Sperlingen auf gesunde Tiere dieser Art übertragen wird, wie die menschlichen Malariaparasiten durch den Anopheles von einem malariakranken Menschen auf einen gesunden. Da sich nun aber nicht nur der Uebergangsmodus, sondern auch der Entwickelungscyklus der Proteosoma- und Malariakeime in so übereinstimmender Weise (in entsprechender Art natürlich) abspielt, so sind wir berechtigt anzunehmen, daß dies bei den Ross'schen Formen (black spores) dieser beiden Parasiten auch der Fall sein wird.

Nun habe ich festgestellt, daß

> die Ross'schen Keime des Proteosoma sich bei Zimmertemperatur $^5/_4$ Jahr lang unverändert halten, bei Bruttemperatur aber bald in unförmliche rundliche Gebilde übergehen und zerfallen.

Daraus schließe ich, daß, sobald diese Ross'schen Keime in den Körper eines warmblütigen Tieres gelangen, sie ebenso zu Grunde gehen, wie in vitro bei Bruttemperatur, also keine zweite Infektionsmöglichkeit abgeben können.

Da fernerhin, wie eben ausgeführt, die weitgehendsten Analogieen zwischen Proteosoma und menschlichen Malariaparasiten bestehen, so glaube ich annehmen zu dürfen, daß sich die Ross'schen Keime der menschlichen Malariaparasiten in entsprechender Weise verhalten, d. h. daß sie zu Grunde gehen, sobald sie in den menschlichen Körper gelangen.

Aber noch ein zweiter, viel gewichtigerer Grund spricht dafür, daß die Ross'schen Keime, wie schon Ross selbst annahm, Involutionsformen sind und mit der Uebertragung der Malaria nichts zu thun haben. Dieser Grund liegt in dem Resultat, das R. Koch bei seinem berühmten Experiment in Stephansort erzielte. Wäre nämlich durch die Ross'schen Keime thatsächlich eine zweite Uebertragungsmöglichkeit gegeben, so hätte es Koch nie gelingen können, der Malaria in Stephansort so weit Herr zu werden, als es thatsächlich geschehen ist.

Technik der Untersuchungen.

Ich spreche im Folgenden nur von der Technik, die bei der Gametenforschung anzuwenden ist.

1) Die conditio sine qua non heißt hier: einwandfrei ausgestrichene und einwandfrei gefärbte Präparate! Die Blutkörperchen müssen in einer Schicht nebeneinander liegen. Die Präparate müssen ohne Farbstoffniederschläge sein.

Die erste Bedingung muß deshalb erfüllt sein, weil in schlecht ausgestrichenen Präparaten die kleinen Tertianringe leicht übersehen werden können; die großen Parasitenformen hingegen deutlich genug hervortreten, um erkannt zu werden. Zählt man nun die Parasiten in solchen Präparaten, so wird die Anzahl der erwachsenen und fast erwachsenen Gameten gegenüber den Ringen zu groß ausfallen und das Resultat unbrauchbar werden.

2) In schlecht ausgestrichenen Präparaten werden die kleinen Ringe verzerrt und zerrissen und man kann dann nicht mehr unterscheiden, wo das Chromatinkorn liegt. Unter solchen Verhältnissen ist natürlich eine auch nur annähernd genaue Bestimmung des Verhältnisses der Schizonten zu den Gameten unmöglich. Aber auch die Halb- und $^3/_4$

erwachsenen Formen sind in schlecht ausgestrichenen Präparaten oft nicht mit Sicherheit als Schizonten resp. Gameten zu erkennen, weil die Parasiten zusammengeschoben und verzerrt werden, und dann selbst in diesen großen Formen Lage und Art des Chromatins nicht mehr mit Sicherheit auszumachen ist.

3) Finden sich in einem sonst gut ausgestrichenen Präparate dicke Stellen, so müssen sie beim Parasitenzählen einfach überschlagen werden.

4) Um Schizonten von Gameten in allen Stadien unterscheiden zu können, muß man die Parasiten nach Romanowsky färben, muß aber dabei vermeiden, die Tüpfelung der Blutkörperchen hervorzurufen. Mit Methylenblau gefärbte Präparate können nur dann verwendet werden, wenn es sich darum handelt, erwachsene Parasiten (in Teilung begriffene oder Teilungsformen) sowie erwachsene Gameten zu zählen. Aber schon bei der Färbung der kleinen Tertianringe färbt sich das innerhalb des Plasmaringes liegende Chromatin nicht immer mit.

5) Zur Feststellung des Verhältnisses zwischen Schizonten und Gameten eignen sich am besten Präparate, in denen die Parasiten spärlich sind. Solche Präparate, in denen sich im ganzen nur etwa gegen 200 Parasiten finden, sind die besten. Denn da ist man imstande, so gut wie alle vorhandenen Parasiten zu zählen (Fall III). Allerdings sind solche Zählungen äußerst mühsam und zeitraubend. Um ein Präparat von 18 qmm durchzuzählen, braucht man 3—4 Stunden.

6) Je zahlreicher die Parasiten in einem Präparat sind, desto mehr davon muß man natürlich zählen, um ein brauchbares Resultat zu erhalten. 300 Parasiten muß man in Präparaten, die reichlich Parasiten enthalten, wenigstens zählen.

7) Will man das Verhältnis der Geschlechter der Gameten zu einander feststellen, so muß man wenigstens 100 Gameten zählen. Das ist aber in bestimmten Fieberstadien, in denen die erwachsenen Gameten nur in einzelnen Exemplaren vorhanden sind, nicht möglich.

8) Um Irrtümer zu vermeiden, empfiehlt es sich, die Präparate immer von derselben Seite her und stets in derselben Richtung durchzuzählen.

Kiel, 5. Juni 1902.

Tafelerklärung.

Fig. I. Gestalt des Chromatins bei den Schizonten und Gameten des Tertianparasiten.

1—6[1]) bei den Schizonten des Tertianparasiten. Es findet sich sowohl in den Jugendformen als auch in den halb und ganz erwachsenen Formen das Chromatin in Stäbchen- und Winkelform.

1a—6c bei den Gameten des Tertianparasiten. Auch bei den Gameten findet sich sowohl in den Jugend- als auch in den halb und ganz erwachsenen Formen das Chromatin in Stäbchen- und Winkelform. Das Chromatin der älteren Formen zeigt die typische Auflockerung des Chromatins, ohne daß eine Teilung eingetreten wäre. In 6b und 6c fehlt die achromatische Zone.

Fig. II. Lage des Chromatins bei den Tertiangameten.

1 Mikrogametocyt, 2 Makrogamet bei Methylenblaufärbung.

1a Mikrogametocyt, 2a Makrogamet nach Romanowsky gefärbt. Aus diesen 4 Figuren ist zu erkennen, daß bei den Gameten des Tertianparasiten das Chromatin innerhalb eines Plasmaringes liegt.

1) In Fig. I, 1 ist durch ein Versehen das Chromatin nicht stäbchenförmig (entsprechend Fig. 1a) gezeichnet werden.

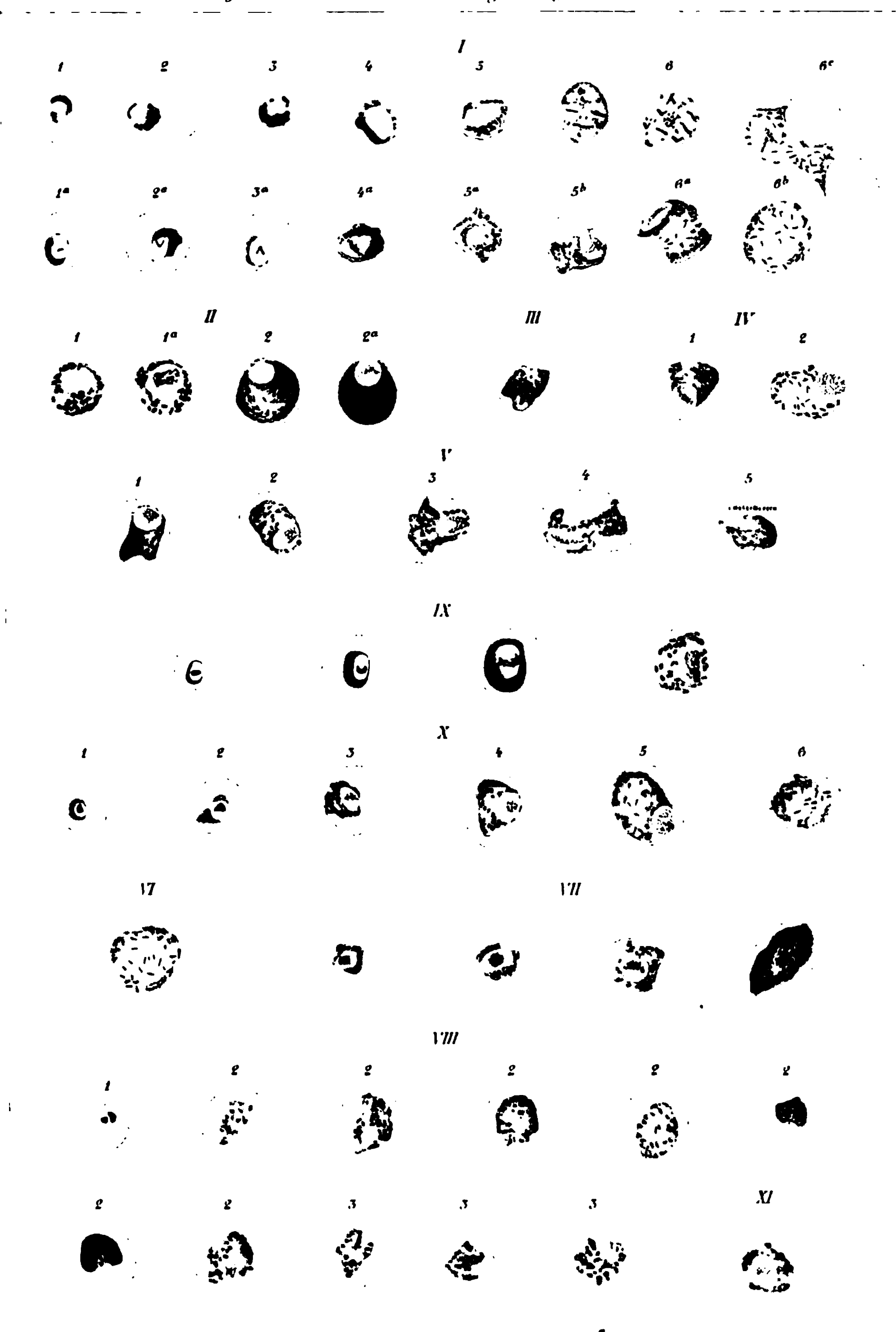

I
II
III
IV
V
IX
X
VI
VII
VIII
XI



Fig. III—VIII. Wachstumsformen des Chromatins und des Plasmas bei den Tertiangameten. Das Plasma ist durchgehends ausgezeichnet durch starre, wenig gegliederte Formen, das Chromatin durch seinen Zerfall in Körnchen. Ueberall ist die Innenfläche des ursprünglichen Tertianringes als achromatische Zone erhalten, mit Ausnahme von Fig. VI.

Fig. III—VI. Plasmawachstum nur von der äußeren Umrandung der mondsichelförmigen Verdickung des ursprünglichen Tertianringes aus.

Fig. III. Geringe Wachstumsenergie des Chromatins.

Fig. IV, 1. Wachstumsenergie des Chromatins stärker, bandförmiges Chromatin.
2 Der haarfeine Teil des ursprünglichen Tertianringes ist zwar verloren gegangen, aber das Chromatin liegt in einem scharfbegrenzten Ausschnitte, der deutlich erkennen läßt, daß er die Umgrenzung der Innenfläche des ursprünglichen Tertianringes darstellt.

Fig. V, 1—3. Mittlere Wachstumsenergie des Chromatins.
1 und 2 Chromatin in Form eines Rhombus.
3 Das Chromatin hat sich der Form des Plasmaringes angepaßt und mondsichelförmig gekrümmt.
4 Das Chromatin hat Stäbchenform angenommen und den Plasmaring gedehnt.
5 Der haarfeine Teil des ursprünglichen Protoplasmaringes ist gesprengt, seine Reste legen sich zusammen, das in Körnchen zerfallene Chromatinstäbchen liegt scheinbar ohne Verbindung außerhalb des Plasmas. Diese Figur ist als Vorstufe der Fig. VI anzusehen.

Fig. VII. Entwickelung eines Tertiangameten, wenn beide Hälften des Tertianringes Flächenwachstum zeigen.

Fig. VIII, 1 und 2. Seltenere Entwickelungsformen des Tertiangameten. Das Chromatin liegt von vornherein außerhalb des ungegliederten Plasmaleibes und zeigt nur ganz geringe Wachstumsenergie und Auflockerung. Achromatische Zone fehlt.
3 Stellen den in Fig. VIII, 2 gegebenen Gameten entsprechend große Schizonten dar. Sie unterscheiden sich von den gleichgroßen Gameten durch ihre in der Mehrzahl auftretenden kompakten Chromatinkörner.

Fig. IX. Entwickelungsgang des Mikrogametocyten des Tertianparasiten. Der Parasit wächst als Ring im ganzen.

Fig. X, 1—5. Entwickelungsgang des Makrogameten des Tertianparasiten bei mittelstarker Chromatinentwickelung.

Fig. X, 6 und Fig. VI. Endstadien der Entwickelung der Makrogameten des Tertianparasiten bei starker Wachstumsenergie des Chromatins (schließliche Sprengung der haarfeinen Hälfte des ursprünglichen Tertianringes unter Verlust der achromatischen Zone).

Fig. XI. Doppelinfektion eines Blutkörperchens durch einen Makrogameten (in der Mitte liegend), der durch einen Schizonten, dessen Chromatin in Teilung begriffen ist, umwachsen ist.

Vergrößerung 1000-fach. Mit Zeiss'schem Zeichenapparate gezeichnet. Um die Parasiten möglichst deutlich hervortreten zu lassen, sind die roten Blutkörperchen nur durch punktierte Linien angedeutet worden.

Ueber Distoma goliath P. J. v. Ben. 1858.

Von **M. Braun**, Königsberg i. Pr., Zool. Museum.

Mit 1 Tafel.

Im Jahre 1858 beschrieb P. J. van Beneden eine aus der Leber von *Balaenoptera rostrata* Fab. stammende Fasciolide, die eine Länge von 80 mm und eine Breite von 15 mm erreicht. Die Art, die den Namen *Distoma goliath* erhielt, lag dem Beschreiber nur in 2 Exemplaren vor, die er von Eschricht in Kopenhagen erhalten hatte. Die Angaben sind äußerst dürftig und beschränken sich, abgesehen von denjenigen über die Eier, auf Verhältnisse, die mit bloßem Auge zu sehen waren, nämlich die Körperform, Lage der Saugnäpfe und Genitalöffnungen sowie den Cirrus. Wir erfahren nur, daß die abgeplatteten Tiere in Größe und Aussehen einem Blutegel gleichen, daß ferner der Mundnapf endständig liegt und größer als der etwas hinter der Körpermitte gelegene Bauchnapf ist; vor letzterem ragte der schlanke, lange und unbewaffnete Cirrus hervor, an dessen Basis die weibliche Geschlechtsöffnung zu erkennen war; die ziemlich dickschaligen und mit einem Deckel versehenen Eier sind nach der Abbildung nur 0,033 mm lang. Aus der beigegebenen Tafel ist zu ersehen, daß das Hinterende sich stark zuspitzt und demnach eine Aehnlichkeit mit einem Blutegel nicht aufweist, sowie daß dem Mundnapfe ein großer ovaler Pharynx folgt.

Einen ähnlichen Riesen, der in der Nähe von Bergen in einer *Balaenoptera* gefunden worden war, konnte Lönnberg untersuchen; das betreffende Exemplar war 70 mm lang, aber nur 9 mm breit und zeigte den Bauchnapf erheblich vor der Körpermitte, nur wenige Millimeter hinter dem Anfange des mittleren Körperdrittels; der Durchmesser des Mundnapfes betrug 2, der des Bauchnapfes 1 mm. Der auch hier vorgestreckte Cirrus hatte an seiner Basis den gleichen Durchmesser wie der Bauchnapf, was auch van Beneden erwähnt; er verjüngte sich nur sehr wenig nach der Spitze zu und war 3,5 mm lang. Das vordere wie hintere Körperdrittel, ersteres mit Ausnahme der nächsten Umgebung des Mundnapfes, waren von großen schwarzen Flecken, die Gruppen von zahlreichen kleinen Dotterstocksfollikeln darstellen, eingenommen; es ließen sich deutlich 4 Längsreihen erkennen, von denen aber die beiden medianen vorn und hinten am mittleren Körperdrittel aufhörten, so daß zu den Seiten dieses nur je eine Gruppe entlang zog; in dem dadurch begrenzten hellen Felde wurde ein vielfach verzweigter Schlauch bemerkt und als „männliche Genitalia“, also Hoden gedeutet. Auch die Dottergänge werden geschildert und der Uterus als hufeisenförmig angegeben. Trotz der verschiedenen Lage des Bauchnapfes, der Genitalöffnungen und der bedeutend geringeren Körperbreite hält Lönnberg seine Form für identisch mit der van Beneden'schen, von der er zur Erklärung der verschiedenen Lage von Bauchnapf und Geschlechtsöffnungen annimmt, daß ihr Hinterende stark kontrahiert war.

Weitere Mitteilungen sind von W. nicht erfolgt; *Dist. goliath* wird zwar noch wiederholt in der Litteratur angeführt, ist aber nicht wieder untersucht worden, so daß die Art als Species inquirenda geführt wird.

Im hiesigen zoologischen Museum befinden sich 3 große Fascioliden, welche als *Dist. goliath* v. Ben. bezeichnet sind und aus der Leber von

Balaenoptera borealis Less. stammen; sonstige Angaben (Sammler, Fundort etc.) fehlen.

Die Untersuchung ergab folgende Resultate: Körper stark abgeplattet, Seitenränder in der größten Erstreckung beinahe parallel, vorn rasch, hinten langsam konvergierend; Länge 75—80 mm, Breite 8 mm; mit bloßem Auge sind die beiden Saugnäpfe sowie der bei allen Exemplaren weit vorgestreckte, schlanke Cirrus zu sehen. Entsprechend der Lage der Dotterstöcke ist etwas mehr als das vordere und das hintere Drittel dunkel, das mittlere gelblichweiß. Die Aufhellung der Tiere mit Kreosot ließ auch hier nicht im Stich, wenn auch selbstverständlich die Untersuchung von frischen Tieren resp. von Schnitten durch gut konservierte noch vieles mehr ergeben wird. Die beiden Saugnäpfe liegen um wenig mehr als ein Drittel der Körperlänge voneinander entfernt; ziemlich dicht vor dem Saugnapfe ragt der Cirrus hervor. Der Mundnapf ist flach schüsselförmig mit weiter, schräg nach vorn gerichteter Mündung; einschließlich der Wandung beträgt sein Durchmesser in der Querrichtung des Tieres 2,3, in der Längsrichtung 2,0 mm, während der Bauchnapf 1,3 mm aufweist.

Bei keinem der 3 Exemplare ist auf der nur dünnen Cuticula irgend etwas von Stacheln oder Schuppen zu bemerken, doch bin ich nicht sicher, ob die dünne, homogene, den Körper begrenzende Schicht wirklich die ganze Cuticula ist.

Fast unmittelbar hinter dem Mundnapfe liegt der kräftige 1,5 mm lange und 0,7 mm breite Pharynx, der im ganzen gestreckt tonnenförmige Gestalt besitzt. Der Praepharynx ist klein und anscheinend selbst muskulös. Ein Oesophagus fehlt, es gabelt sich vielmehr dicht hinter dem Pharynx der Darm, die Darmschenkel ziehen zunächst fast quer nach den Seiten und biegen dann nach hinten um; wegen der sie von beiden Flächen deckenden Gruppen von Dotterstocksfollikeln sind sie nur schwer zu verfolgen; immerhin ergiebt sich, daß sie verhältnismäßig nahe den Seitenrändern in leicht welligem Verlaufe nach hinten ziehen und erst dicht vor dem Hinterrande enden. Leicht dagegen ist festzustellen, daß sie in ihrem ganzen Verlaufe sowohl nach außen wie medianwärts mit zahlreichen, selbst wieder sich verzweigenden Seitenästchen besetzt sind, welche entsprechend der Lage der Darmschenkel nach außen kürzer, nach innen länger entwickelt sind. Ihre Zahl habe ich, da sie ebenfalls von den Dotterstöcken zum guten Teile verdeckt werden, nicht bestimmen können; aber schon der Umstand, daß wenigstens die inneren Seitenästchen je einen großen Raum einnehmen, weist auf eine verhältnismäßig geringe Zahl hin und dies läßt sich auch für das mittlere Körperdrittel, in dem die Dotterstöcke, wie Lönnberg angiebt, schwächer entwickelt sind und infolgedessen ein freierer Einblick gegeben ist, direkt feststellen; ich zähle hier an nach innen gerichteten Seitenästen auf eine Länge von 20—22 mm nur 12—13, was für die ganze Länge des Darmschenkels etwa 40—45 mediane Anhänge geben würde. Ob die nach außen gerichteten in der gleichen Anzahl vorhanden oder zahlreicher sind, kann ich nicht mit Bestimmtheit angeben, doch hat es wenigstens im mittleren Körperdrittel den Anschein, daß sie in der gleichen Anzahl wie die medianen auftreten und mit diesen ziemlich regelmäßig alternieren. Am vorderen Körperende liegen jedoch die Verhältnisse anders; hier trägt der quer gerichtete Anfangsteil jedes Darmschenkels, kurz ehe er sich nach hinten wendet, einen langen, zickzackförmig nach vorn verlaufenden Anhang, der bis

fast zur Mitte des Mundnapfes reicht und an seiner äußeren Seite mit 4 von vorn nach hinten an Länge zunehmenden Blindsäckchen besetzt ist; diesem nach vorn gerichteten Anhange folgt dann jederseits, schon auf der Umbiegungsstelle sitzend, ein kurzer, äußerer Blindsack und erst hinter diesem tritt der erste der median gerichteten Anhänge auf.

Vom Nervensystem habe ich nichts finden können und von den Exkretionsorganen nur andeutungsweise am Hinterende ein Stück des schlauchförmigen Endabschnittes.

Was die männlichen Geschlechtsorgane anlangt, so hat Lönnberg in der That die Hoden an der ihnen zukommenden Stelle gesehen, jedoch in ihrer Form nicht erkannt; es ist, was ja von vornherein zu erwarten war, nicht ein und auch nicht ein schlauchförmiger Hoden vorhanden, sondern zwei verästelte; sie sind für die Länge des Tieres und im Vergleiche mit *Fasciola hepatica* L. verhältnismäßig klein, da sie nur wenig mehr als die hintere Hälfte des mittleren Körperdrittels einnehmen, in der sie hintereinander liegen. Der vordere etwas kürzer als der hintere (5 resp. 7 mm), beide verästelt, aber in der Form insofern verschieden, als der vordere mehr strahlig erscheint, da die wenigen, etwas gewundenen und an den Enden angeschwollenen Aeste von einem Punkte ausgehen, während die Aeste des hinteren Hodens seitlich von einem medianen, etwas schräg verlaufenden Mittelstück abtreten; demnach hat der hintere Hoden Aehnlichkeit mit dem Uterus einer Tänie, wenngleich die Seitenzweige nicht so zahlreich sind. Das Vas efferens des vorderen Hodens entspringt aus seinem Centrum, das des hinteren ist eine direkte Fortsetzung des medianen Teiles; beide lassen sich eine Strecke weit nach vorn verfolgen. Nicht festzustellen war ihre Vereinigungsstelle; auch über den Cirrusbeutel kann ich nichts aussagen; man bemerkt ihn als rundlichen Körper an der Basis des ausgestreckten Cirrus.

Von den weiblichen Organen sind die Dotterstöcke außergewöhnlich stark entwickelt; sie nehmen beide Körperflächen, mit Ausnahme der von den Hoden und dem Uterus besetzten Stellen, ein; hier finden sie sich nur an den Seitenrändern, dehnen sich jedoch auf der Rückenfläche mehr nach der Mittellinie zu aus als auf der Bauchseite. Die einzelnen Acini sind sehr klein; in großer Zahl treten sie zu flachen, etwa quadratischen oder rechteckigen Gruppen zusammen, die sich am Hinterende des Tieres leicht, vorn schwerer voneinander abgrenzen lassen. Die Angaben von Lönnberg, daß im vorderen und hinteren Körperdrittel 4, zu den Seiten des mittleren nur je 1 Gruppe vorhanden ist trifft im allgemeinen zu, nur ist im Hinterende jederseits nur eine Reihe von Gruppen vorhanden.

Die Ausführungsgänge der Dotterstöcke verhalten sich nicht ganz gleich: bei dem einen Exemplare, das abgebildet worden ist, findet sich vorn ein langer, hinten ein kurzer, unpaarer, in der Mittellinie ziehender Gang; beide spalten sich in zwei neben der Mittellinie verlaufende Kanäle und jederseits entsteht dann dicht hinter dem Keimstock aus dem vorderen und hinteren Kanale der quere Dottergang. Wo diese zusammenstoßen, liegt ein kleines Dotterreservoir. Bei einem anderen Exemplar erstrecken sich die beiden hinteren Longitudinalkanäle bis zum Hinterende — ein hinterer unpaarer Gang ist also nicht zur Ausbildung gekommen, doch stehen die hinteren Kanäle durch 3 Queranastomosen in Verbindung; auch bei dem 3. Exemplar fehlt der hintere

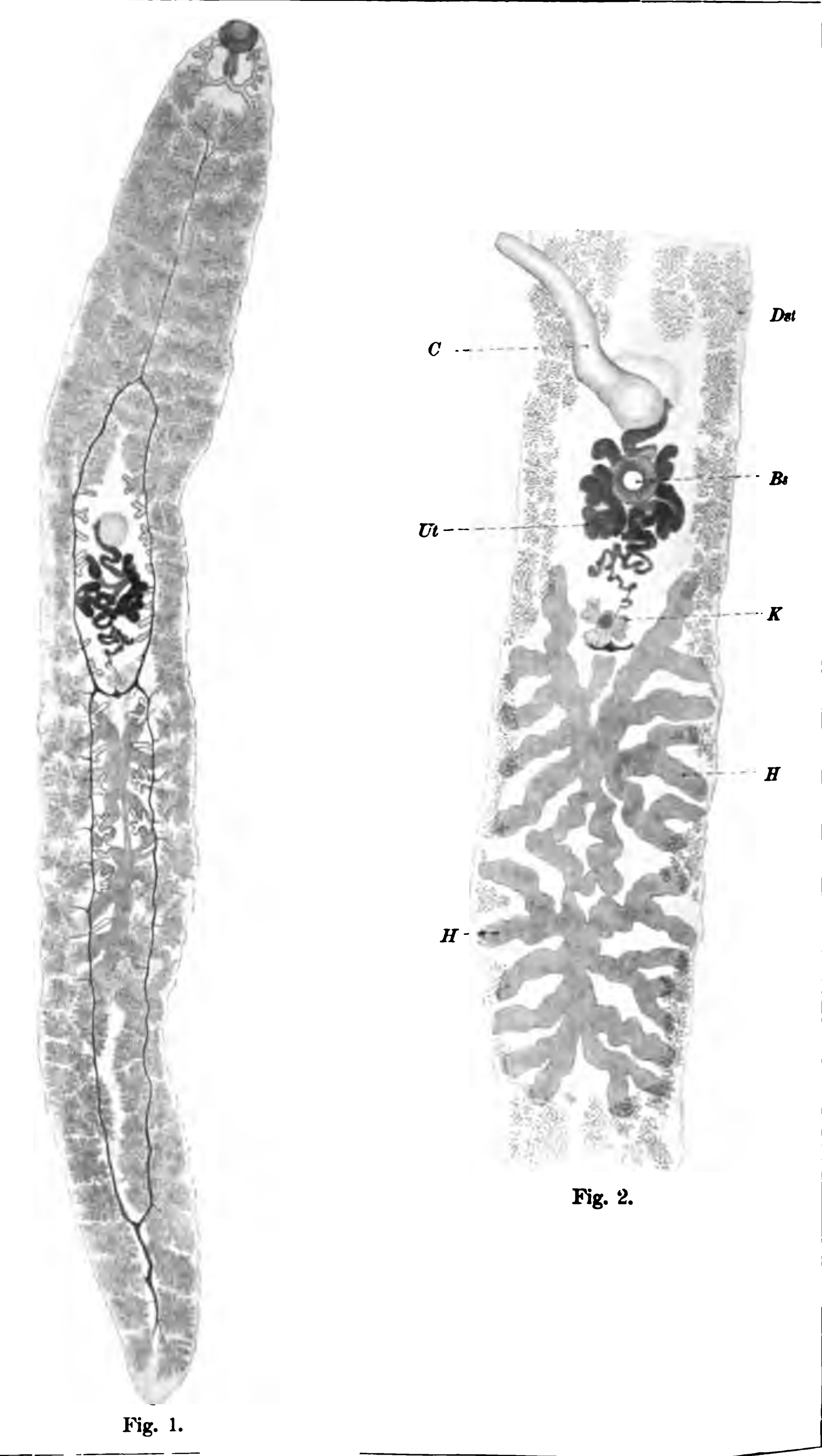


Fig. 1.

Fig. 2.

ustav Fischer in Jena.

unpaare Längskanal, doch vermisse ich hier Queranastomosen, vielleicht nur deshalb, weil sie nicht gefüllt sind.

Unmittelbar vor den queren Dottergängen liegen Keimstock und Schalendrüse; letztere ist ein rundlicher Körper von etwa 0,3 mm Durchmesser, wogegen der Keimstock ziemlich stark verästelt ist. Der Uterus, der nur aus einem aufsteigenden Schenkel besteht, bildet um den Bauchnapf herum ein Konvolut von Schlingen und mündet neben dem Cirrusbeutel aus. Die ihn füllenden, dunkelbraunen Eier sind gedeckelt, ziemlich dickschalig, 0,104—0,114 mm lang, 0,062 mm breit.

Nach diesen Bemerkungen scheint es mir nicht zweifelhaft, daß die von Lönnberg und mir untersuchten Exemplare zu einer Art gehören, dagegen ist es fraglich, ob uns *Distoma goliath* v. Ben. vorgelegen hat; erst die Untersuchung der Typen kann hierüber Gewißheit geben. Ich persönlich halte eine spezifische Verschiedenheit zwar für wahrscheinlich, unterlasse jedoch die Benennung der mir vorliegenden Art. Jedenfalls besteht aber die Notwendigkeit, für diese letztere eine besondere Gattung aufzustellen, denn weder *Fasciola* noch *Fasciolopsis* noch *Campula* können für die Einreihung der hier beschriebenen Art in Frage kommen, obgleich unzweifelhaft eine Fascioline vorliegt. Ich nenne die Gattung ***Lecithodesmus***; eventuell ist *Distoma goliath* v. Ben. eine zweite Art.

Königsberg i. Pr., den 28. August 1902.

Litteratur.

1) van Beneden, P. J., Note sur une nouv. esp. de Distome, le géant de sa famille, habitant le foie d'une Baleine, nommé *Dist. goliath.* (Bull. Acad. roy. de Belg. Année XXVII. Sér. 2. T. V. Brux. 1858. p. 95—97. 1 pl.)

2) Lönnberg, E., Mitteil. üb. einige Helminthen a. d. zool. Museum der Universität zu Christiania. (Verhandl. d. biol. Ver. Stockholm. Bd. III. 1891 [p. 8 d. Sep.-Abdr.].)

Tafelerklärung.

Fig. 1. *Lecithodesmus* sp., auf dem Bauch liegend; 2³/₄ mal vergrößert. Vorn Mundnapf, Pharynx und Anfangsteil der Darmschenkel, im Genitalfeld nach innen von den Dottergängen die Enden der medianen Darmblindsäcke, ferner in der Mittellinie Cirrusbeutel, Uterus, Keimstock und die beiden Hoden, zu den Seiten die Gruppen der Dotterstocksfollikel, die auch fast das ganze Vorder- sowie das Hinterende einnehmen.

Fig. 2. Die mittlere Körperpartie desselben Exemplares, auf dem Rücken liegend: 4¹/₂ mal vergrößert.

Bs Bauchnapf; *C* Cirrus; *Dst* Dotterstocksfollikel; *H* Hoden; *K* Keimstock mit Schalendrüse; *Ut* Uterus.

NB. Bei der notwendig gewordenen Verkleinerung der Originalzeichnungen und der gewählten Vervielfältigungsart sind leider manche Details, besonders in bezug auf die Gruppierung der Dotterstocksfollikel, verloren gegangen.

Ueber den antiseptischen Wert des Argentum colloïdale Credé und seine Wirkung bei Infektion.

[Aus dem kgl. hygienischen Institute zu Königsberg i. Pr. (Direktor: Prof. Dr. R. Pfeiffer.)]

Von Dr. **Ernst Cohn** in Königsberg i. Pr.

(Schluß.)

Versuche mit Streptokokken.

Die Reinzüchtung derselben erfolgte aus Absceßeiter vom Menschen. Um die Kokken für Kaninchen virulent zu machen, injizierte ich einem solchen eine ganze Bouillonkultur intravenös. Als das Tier am 4. Tage nach der Infektion gestorben war, schickte ich die aus ihm rein gezüchteten Streptokokken durch ein weiteres Tier; dieses starb nach intravenöser Injektion von $^1/_5$ Bouillonkultur derselben bereits nach 2 Tagen. Durch weitere Tierpassagen steigerte ich nun die Virulenz der Streptokokken derartig, daß $^1/_{10}$ Bouillonkultur ein Kaninchen von 1100 g Gewicht bereits nach 22 Stunden zu töten vermochte. Die aus diesem Tiere gewonnenen Reinkulturen benutzte ich zu folgenden Versuchen, welche ich gleichzeitig anstellte.

Versuch X. Kaninchen I, Kontrolltier, Gewicht 1200 g. Ich ritzte demselben mit einem Messer ganz oberflächlich die Haut an verschiedenen Stellen des einen Ohres ein. In diese feinen Kratzeffekte rieb ich mittels Platinspatels, nachdem die Haut zuvor sauber rasiert worden war, 2 Oesen der letzterwähnten Streptokokkenkultur kräftig ein. In gleicher Weise infizierte ich Kaninchen II, 1190 g wiegend, Kaninchen III, 1210 g schwer, und Kaninchen IV, das ein Gewicht von 1200 g hatte.

Einem der letztgenannten 3 Tiere, und zwar Kaninchen II, hatte ich vor der Impfung mit Streptokokken eine Collargollösung, 0,1 Argentum colloïdale enthaltend, in die Randvene des nicht infizierten Ohres gespritzt. Ich wartete nun bei sämtlichen Tieren die Entwickelung eines Erysipels ab, welche in der That am Morgen des 2. Tages begann. Die Ohren schwollen an, röteten sich stark und sanken im Gegensatz zu den aufrecht stehenden gesunden schlaff herab. Die Rötung und Schwellung nahm im Laufe des Tages noch etwas zu, so daß ich mich am Morgen des 3. Tages entschloß, bei Kaninchen III und IV die Silberbehandlung einzuleiten. Die Temperatur war bei sämtlichen Tieren annähernd gleich hoch (40,0—40,1) und im Vergleich zu der des vorigen Tages etwas erhöht. Das Allgemeinbefinden der Tiere war einstweilen in keiner Weise gestört, ausgenommen Kaninchen II, das mir etwas matt vorkam.

Ich verfuhr nun in der Weise, daß ich Kaninchen IV 0,1 Argentum colloïdale in Lösung in eine Ohrvene injizierte, Kaninchen III dagegen die aus der Dresdener Marienapotheke bezogene Credé'sche Salbe in die rasierte, gründlich gereinigte Bauchhaut 20 Minuten lang kräftig einrieb. Das verriebene Quantum betrug 4 g. Nachdem ich in dieser Weise am Vormittage des 3. Tages post infectionem die Silberbehandlung begonnen hatte, beobachtete ich weiter Temperatur, Erysipel und Allgemeinbefinden, ohne indessen an diesem und dem folgenden Tage

eine Aenderung in günstigem Sinne bei den mit Collargol behandelten Tieren konstatieren zu können. Im Gegenteil! Kaninchen II, das mit Argentum colloïdale vorbehandelte Tier, zeigte nicht nur ein Fortschreiten des Erysipels, sondern auch eine erhebliche Verschlimmerung des Allgemeinbefindens. Am Abende des 4. Tages nahm die Temperatur subnormale Werte an, am Morgen des 5. Tages starb das Tier. Die sofort vorgenommene Sektion ergab außer ein paar linsengroßen Abscessen in Leber und Nieren nichts Charakteristisches für die Infektion; dagegen lieferten Ausstriche aus Milz, Nieren und Herzblut auf Agar am nächsten Tage massenhafte Reinkulturen von Streptokokken.

Bei Kaninchen III, das ich mit der Salbe behandelt hatte, vermochte das Silber die Krankheit ebensowenig zu coupieren, Erysipel und Allgemeinzustand verschlimmerten sich, die Temperatur blieb andauernd hoch (40,1°). Am Vormittage des 5. Tages starb das Tier; die Sektion ergab als Todesursache Septikämie, aus Nieren und Herzblut wuchsen Reinkulturen von Streptokokken.

Auch bei Kaninchen IV konnte ich von der am Vormittage des 3. Tages erfolgten Injektion von 0,1 Collargol nicht den geringsten Einfluß auf die Krankheit bemerken. Das Erysipel breitete sich über das ganze Ohr aus, die Temperatur stieg (40,2°). Ich wiederholte daher am Morgen des 4. Tages die intravenöse Injektion und injizierte abermals 0,1 Collargol. Als auch hierauf keine Besserung erfolgte, machte ich am Abend desselben Tages eine intravenöse Injektion von 0,05 Argentum colloïdale. Am nächsten, 5. Tage hatte sich das Erysipel so verschlimmert, daß bereits ein Stückchen des geimpften, ad maximum geschwollenen Ohres gangränös zu werden begann. Ich ließ nun eine vierte Injektion von 0,05 Collargol in die Vene des gesunden Ohres folgen, um wenigstens noch den schweren septischen Allgemeinzustand des Tieres günstig zu beeinflussen. Vergebens!

Trotz der 4 intravenösen Collargolinjektionen starb das Tier am Vormittage des 6. Tages. Bei der Sektion des Kaninchens fand ich in beiden Nieren mehrere kleine Abscesse; auch gelang es, aus Herzblut und Nieren am anderen Tage Reinkulturen von Streptokokken zu bekommen. Todesursache also auch hier Septikämie.

Am längsten lebte das Kontrolltier; nachdem sich das Erysipel während der ersten 4 Tage ebenso wie bei den übrigen Kaninchen unter andauernd hohen Temperaturen (40—40,2°) weiter entwickelt und allmählich einen schweren Allgemeinzustand hervorgerufen hatte, schien es vom 5. Tage ab zurückzugehen. Indessen verschlimmerte sich das Allgemeinbefinden; unter subnormalen Temperaturen starb das Tier am Nachmittage des 7. Tages, wie die Sektion bestätigte, an Septikämie. Aus Herzblut und Nieren Aufkeimen zahlreicher Reinkulturen von Streptokokken.

Versuche mit Milzbrand.

Die zu diesen Versuchen benutzte Stammkultur wurde mir gütigst von Herrn Dr. Symanski, erstem Assistenten am hiesigen hygienischen Institute, zur Verfügung gestellt und war aus einem an Milzbrand gefallenen Stiere gezüchtet worden. Um dieselbe für Kaninchen virulent zu machen, injizierte ich einem solchen eine Aufschwemmung von 2 Oesen in 2 ccm Kochsalzlösung subkutan. Das Tier starb nach $1^1/_2$ Tagen, aus Milz und Nieren gingen massenhaft Reinkulturen von Bacillus anthracis auf.

Es kam mir nun darauf an, annähernd wenigstens die minimale letale Dosis dieser Kultur für Kaninchen zu bestimmen. Zu diesem Zwecke injizierte ich einem Kaninchen von 950 g 1 Oese der letzterwähnten Kultur, einem zweiten von demselben Gewichte $^1/_2$ Oese, einem dritten, 950 g wiegenden, endlich $^1/_5$ Oese. Während die beiden ersten Tiere schon nach $1^1/_2$ Tagen eingingen — bei der Sektion zeigte sich eine bedeutende Schwellung der dunkelblaurot verfärbten Milz, sehr starkes Oedem der Hautdecken, auch gingen aus Milz und Nieren reichlich Milzbrandbacillen auf — starb das dritte Tier erst nach ungefähr $3^1/_2$ Tagen. Ein viertes Kaninchen, dem ich $^1/_{10}$ Oese derselben Kultur subkutan injizierte, ging erst nach 4 Tagen ein; die Sektion ergab auch bei diesem Tiere einwandsfrei Milzbrand als Todesursache. Das Gewicht des Tieres betrug 920 g. Unter Berücksichtigung des Umstandes nun, daß ich für die Versuche selbst viel schwerere Tiere ausgewählt hatte als für diese Vorversuche, konnte ich die beiden letzterwähnten Dosen von $^1/_5$ und $^1/_{10}$ Oese wohl als die gewünschten annähernd minimalen letalen betrachten. Ich stellte nun folgende Versuche gleichzeitig an.

Versuch XI. Kaninchen I, 1300 g wiegend, dient als Kontrolltier. Dasselbe erhält $^1/_5$ Oese der für die Vorversuche benutzten, durch ein Kaninchen geschickten Milzbrandkultur subkutan injiziert.

Kaninchen II, 1330 g wiegend, erhält ebenfalls $^1/_5$ Oese derselben Kultur in subkutaner Injektion; nach 10 Minuten injizierte ich ihm 0,1 Collargol in wässeriger Lösung in die Randvene eines Ohres. Das Befinden beider Tiere wies keine wesentlichen Unterschiede auf; am 2. Tage dagegen ging es mit dem mit Argentum colloïdale behandelten Kaninchen erheblich schlechter als dem Kontrolltier, am Vormittage des 3. Tages, also 36 Stunden nach der Injektion, starb Kaninchen II. Das Kontrolltier war nun um diese Zeit schon sehr matt, starb jedoch erst 12 Stunden später, also 48 Stunden post infectionem. Die Sektion ergab bei beiden Tieren ein starkes Oedem der Hautdecken, welche auf der Schnittfläche glasig aufgequollen waren, und vor allem auch die charakteristische starke Schwellung und blaurote Verfärbung der Milz. Ausstrichpräparate von Nieren, Milz und Lungen zeigten bei beiden Tieren massenhafte Milzbrandbacillen, und zwar bei Kaninchen II in noch größerer Anzahl als bei Kaninchen I. Genau so verhielt es sich mit dem Ausstrich des Herzblutes. Aus letzterem, wie aus Milz und Nieren keimten Reinkulturen von Bacillus anthracis auf.

Versuch XII. Kaninchen I, Gewicht 1200 g, wird als Kontrolltier benutzt. Es erhält $^1/_{10}$ Oese der in Versuch XI angewandten Milzbrandkultur subkutan injiziert.

Kaninchen II, 1170 g wiegend, erhält ebenfalls eine subkutane Injektion von $^1/_{10}$ Oese derselben Kultur. Nach 10 Minuten werden ihm 0,1 g Collargol in wässeriger Lösung (5 ccm) in die Randvene eines Ohres eingespritzt.

Das Befinden beider Tiere verschlechterte sich am 2. Tage nach der Infektion. Am 3. Tage waren die Tiere schon sehr matt, am Morgen des 4. starben sie fast gleichzeitig. Die Sektion ergab bei beiden als Todesursache Milzbrand. In Ausstrichpräparaten fanden sich massenhaft Milzbrandbacillen, namentlich von Lunge, Milz und Herzblut. Eine Verminderung des Bacillengehaltes gegenüber dem Kontrolltiere war bei Kaninchen II nicht zu konstatieren. Aus den genannten Organen beider Tiere wuchsen Reinkulturen von Bacillus anthracis.

Versuch XIII. Kaninchen I, Gewicht 1210 g, dient als Kontrolltier. Es erhält $^1/_{10}$ Oese der in Versuch XI benutzten Milzbrandkultur subkutan injiziert.

Kaninchen II, 1225 g wiegend, wird eine Silberlösung, enthaltend 0,1 Collargol, in die Randvene eines Ohres eingespritzt. 10 Minuten später folgt die subkutane Injektion von $^1/_{10}$ Oese derselben Milzbrandkultur. Am Abend des 3. Tages nach der Infektion starben beide Tiere fast gleichzeitig, Kaninchen II eine Stunde früher als das Kontrolltier. Die Sektion beider Tiere zeigte das ausgesprochene Bild schwerer Milzbrandinfektion. Ausstrichpräparate aus Nieren, Lunge, Milz enthielten zahlreiche Milzbrandbacillen, ebenso wie die Ausstriche von Herzblut, bei beiden Tieren. Ein Vergleich in Bezug auf Bacillenanzahl zwischen den Ausstrichen der Organe und des Herzblutes von Kaninchen I und II fiel augenfällig zu Ungunsten des mit Collargol behandelten Tieres aus. Aus Milz, Blut und Nieren wieder üppiges Aufkeimen von Reinkulturen des Bacillus anthracis.

Versuch XIV. Kaninchen I, Kontrolltier, wiegt 1200 g und erhält eine subkutane Injektion von $^1/_{10}$ Oese der zu den bisherigen Versuchen benutzten Milzbrandkultur.

Kaninchen II, 1226 g wiegend, erhält ebenfalls subkutan $^1/_{10}$ Oese der genannten Kultur. Nach 15 Minuten injizierte ich ihm in die Randvene eines Ohres 0,1 Collargol in Lösung (5 ccm Aqu. dest.).

Am 1. Tage war bei beiden Tieren eine Aenderung des Befindens nicht bemerkbar; nichtsdestoweniger injizierte ich Kaninchen II am Abend des 1. Tages nochmals eine Collargollösung intravenös, welche 0,05 Argentum colloïdale enthielt. Am 2. Tage war bei beiden Tieren das Allgemeinbefinden noch sehr wenig gestört; Kaninchen II erhielt am Vormittage dieses Tages eine abermalige intravenöse Injektion von 0,1 Collargol. Am 3. Tage machten beide Tiere bereits einen matten Eindruck. Ich injizierte jetzt dem mit Collargol behandelten Tiere zum 4. Male intravenös eine Lösung von 0,1 Argentum colloïdale in 5 ccm destillierten Wassers. Bei dieser Injektion, die ebenso wie die vorigen in die Randvene eines Ohres erfolgte, quoll mir aus der Schnittöffnung, welche ich machte, um die Vene bloßzulegen, bereits Oedemflüssigkeit entgegen. Am Nachmittage und Abend des 3. Tages boten beide Tiere die Zeichen schwerer Allgemeinerkrankung. Am Morgen des 4. Tages starb das mit Collargol behandelte Kaninchen; das Kontrolltier verendete 3 Stunden später. Bei der Sektion von Kaninchen II fand sich außer den typischen Zeichen schwerer Milzbrandinfektion eine schwarzbraune Verfärbung der Leber und Milz, sowie stellenweise eine schwärzliche Tüpfelung der Lungen, welche augenscheinlich von Silberniederschlägen herrührte. Ausstrichpräparate ergaben große Mengen von Bac. anthracis in Nieren, Milz, Lungen und Herzblut. Die Sektion des Kontrolltieres ergab ebenfalls Milzbrand als Todesursache. Ein Vergleich der Ausstriche aus denselben Organen dieses Tieres mit den oben erwähnten des Kaninchen II in Bezug auf Milzbrandbacillenreichtum mußte auch hier zu Ungunsten des mit Collargol behandelten Tieres ausfallen.

Auch hier gelangten aus Nieren, Milz und Herzblut beider Tiere Reinkulturen von Bacillus anthracis zur Entwickelung.

Versuche mit Cholera.

Für diese Zwecke wurde mir gütigst eine virulente Cholerakultur des Institutes, welche durch fortgesetzte Tierpassagen auf dem Virulenzgrade von $^1/_{10}$ Oese erhalten worden war, zur Verfügung gestellt.

Ich machte diese Choleraversuche hauptsächlich aus dem Grunde, weil sie Gelegenheit boten, bei bestimmter Versuchsanordnung direkt die Einwirkung der Collargollösung auf die Vibrionen im Tierkörper zu kontrollieren.

Zu diesem Zwecke spritzte ich dem mit Argentum colloïdale zu behandelnden Tiere die Silberlösung wie die Vibrionenaufschwemmung in die Bauchhöhle ein, und zwar ließ ich die Collargolinjektion einmal der Cholerainjektion folgen, einmal voraufgehen, um ebenso wie in den bisher beschriebenen Versuchen zu prüfen, ob das Resultat ein anderes wäre, wenn die Silberdarreichung erst nach bereits stattgehabter Infektion erfolgte.

In bestimmten Zeitabständen entnahm ich alsdann mittels steriler Glaskapillaren Exsudatproben aus der Peritonealhöhle, um festzustellen, wie schnell resp. ob überhaupt eine dauernde Abtötung der Vibrionen oder wenigstens doch eine langdauernde Entwickelungshemmung erfolgte, was bekanntlich an der Granulabildung leicht festzustellen ist. Im einzelnen gestalteten sich die Versuche und ihr Verlauf in folgender Weise.

Versuch XV. Meerschweinchen I wiegt 290 g und dient als Kontrolltier. Dasselbe erhält $^1/_8$ Oese der genannten Cholerakultur in die Bauchhöhle injiziert.

Meerschweinchen II hat ein Gewicht von 265 g und erhält zunächst eine Injektion von 0,05 Collargol in Lösung von 5 ccm destillierten Wassers in die Bauchhöhle. 10 Minuten später folgt die intraperitoneale Einspritzung von $^1/_8$ Oese derselben Kultur.

Sofort nach der Injektion wurden den Tieren in der geschilderten Weise Exsudatproben entnommen. Dabei ergab die mikroskopische Untersuchung bei beiden Tieren zahlreiche Vibrionen, keine Körnchen. Ein deutlicher Unterschied zwischen den Befunden beider Tiere ließ sich nicht feststellen.

Nach 25 Minuten folgte eine abermalige Entnahme. Schon jetzt fanden sich bei den Tieren ohne deutlichen Unterschied der beiden Befunde kleine Mengen von Granulis außer den sehr zahlreichen Vibrionen. Nach weiteren 25 Minuten eine dritte Entnahme. Jetzt war die Körnchenbildung bei beiden Tieren schon etwas vorgeschritten, und zwar schien es, als ob bei Meerschweinchen II mehr als bei dem Kontrolltier.

Eine vierte Entnahme, die ich nach weiteren 50 Minuten folgen ließ, zeigte bereits eine Abnahme der Granula und Vermehrung der Vibrionen bei beiden Tieren ohne feinere Differenzen. Nach diesem Befunde war der Tod der Tiere unvermeidlich. Die Beobachtung wurde nun nach 12-stündiger Pause weiter fortgesetzt; die Tiere waren jetzt schon sehr matt und eine Entnahme von Exsudatproben zeigte, daß bei beiden Tieren die Vibrionen sich massenhaft vermehrt hatten; von Granulis war so gut wie nichts mehr zu sehen. Nach 16 Stunden starb das Kontrolltier. Von Meerschweinchen II wurden noch 2mal Proben entnommen, welche beide zahlreiche Vibrionen zeigten, die Körnchen waren fast vollständig verschwunden. Es starb 4 Stunden nach dem Kontrolltiere, also im ganzen 20 Stunden post infectionem.

Versuch XVI. Meerschweinchen I, Kontrolltier, Gewicht 250 g, enthält $^{1}/_{8}$ Oese derselben Cholerakultur intraperitoneal injiziert.

Meerschweinchen II, 230 g wiegend, wird die gleiche Dosis in die Bauchhöhle eingespritzt. Nach 10 Minuten folgt die intraperitoneale Injektion von 0,05 Collargol in 5 ccm destillierten Wassers gelöst.

Erste Entnahme von Bauchexsudat, sofort vorgenommen, ergiebt folgendes:

Bei Meerschweinchen I zahlreiche Vibrionen, keine Granula, bei Tier II derselbe Befund. Nsch 25 Minuten zweite Entnahme. Bei beiden Tieren ohne Unterschied zahlreiche Vibrionen, wenige Körnchen.

Die dritte Entnahme der Exsudatproben erfolgt nach weiteren 50 Minuten und ergiebt bei Tier I eine Vermehrung der Granula und Verminderung der Vibrionen, bei Tier II dagegen umgekehrt eine Vermehrung der Vibrionen und Verminderung der Körnchenbildung.

30 Minuten später ließ ich eine vierte Entnahme folgen, welche dieselben Befunde wie die dritte, nur noch ausgeprägter, erheben ließ. Bei Meerschweinchen II waren jetzt fast gar keine Granula mehr zu entdecken, dagegen hatten sich die Vibrionen kolossal vermehrt. Diesen Befunden entsprechend gestaltete sich auch der weitere Verlauf des Versuches. Während das Kontrolltier am Leben blieb, starb das Meerschweinchen II am Morgen des folgenden Tages genau 24 Stunden nach erfolgter Infektion.

Obige Versuchsreihe lehrt in vollkommen eindeutiger Weise, daß dem löslichen Silber selbst in außerordentlich großen Dosen eine Wirkung weder auf lokale noch allgemeine infektiöse Prozesse zukommt. In keinem Falle hat es die infizierten Tiere durch Vernichtung der im Körper kreisenden Bakterien zu retten vermocht. Vielmehr ergab die in jedem einzelnen Falle angestellte bakteriologische Untersuchung der Organe post mortem die reichliche Anwesenheit der Infektionserreger in denselben.

Fasse ich die Resultate meiner Untersuchungen kurz zusammen, so hat sich folgendes ergeben:

Schon 45 Minuten nach seiner Einführung in die Blutbahn ist das Argentum colloïdale im Blute nicht mehr nachzuweisen. Vielmehr wird es aus demselben im unmittelbaren Anschlusse an seine Einverleibung in fast sämtlichen Organen niedergeschlagen. Diesem Niederschlage kommt eine antibakterielle Wirksamkeit bei Infektionen nicht zu.

Zum Schlusse meiner Arbeit erfülle ich die angenehme Pflicht, meinem hochverehrten Lehrer, Herrn Professor Dr. R. Pfeiffer, für die Anregung zu dieser Arbeit, die freundlichen Anweisungen bei Anfertigung derselben und das meinen Untersuchungen stets entgegengebrachte Interesse meinen aufrichtigsten Dank auszusprechen.

Ueber den Nachweis von Schutzstoffen gegen Hundswut beim Menschen.

[Aus dem staatl. serotherapeut. Institute in Wien (Vorstand: Prof. R. Paltauf).]

Ausgeführt mit Unterstützung der Gesellschaft zur Förderung deutscher Kunst, Wissenschaft und Litteratur in Böhmen.

Von

Privatdocenten Dr. **R. Kraus** und Dr. **B. Kreissl,**
Assistenten am Institute. Sekundärarzt am Rudolfsspitale.

Daß im Serum der mit Lyssavirus behandelten Tiere spezifische Schutzstoffe auftreten, ist zuerst im Jahre 1889 von Babes und Lepp (1) nachgewiesen worden.

Durch diese und die weiteren Arbeiten von Babes und Tizzoni (2) und ihren Schülern, die sich mit der Serumtherapie der Lyssa beschäftigen, hat auch die Frage über den Mechanismus der Pasteurschen Schutzimpfung einen wesentlichen Fortschritt erfahren.

In einer früheren Arbeit konnten wir zeigen (Kraus, Keller und Clairmont) (3), daß das ins Gehirn gegen Lyssa immunisierter Kaninchen eingebrachte Virus nicht mehr nachweisbar ist. Diese Thatsache, zusammengehalten mit dem erbrachten Nachweise der Schutzstoffe im Serum solcher Tiere, führte uns zu der Annahme, daß die Schutzimpfung nach Pasteur darin begründet sein dürfte, daß, sowie bei anderen Infektionskrankheiten, auch hier die künstliche Immunität auf die entstehenden Immunstoffe zurückzuführen sein dürfte und als aktive Immunisierung, analog den Schutzimpfungen gegen Cholera, Typhus, Pest, aufzufassen sei.

Zu derselben Auffassung über den Mechanismus der Schutzimpfung nach Pasteur gelangte auch Marx (4). Inwieweit aber Marx berechtigt war, aus seinen Versuchen diese Anschauung zu vertreten, haben wir bereits in der angeführten Arbeit auseinandergesetzt.

Wenn auch durch unsere Versuche die Möglichkeit einer solchen Auffassung der Schutzimpfung zugestanden werden konnte, haben weitere Versuche (Kraus und Maresch) (5) doch nach einem direkten Beweise verlangt. Wir konnten nämlich zeigen, daß nicht bei allen Tieren Schutzstoffe gegen Hundswut entstehen. Bei Kaninchen, Hunden, Schafen ist das Entstehen von Schutzstoffen nach Immunisierung mit Virus festgestellt. Hühner, die ebenfalls für das Lyssavirus empfänglich sind, allerdings schwerer empfänglich als die angeführten Tierarten, liefern, trotzdem sie lange Zeit mit unverdünntem Virus behandelt wurden, gar keine nachweisbaren Schutzstoffe. Die Impfung solcher Hühner zeigt dann, daß diese Tiere, ohne daß Schutzstoffe im Serum nachweisbar wären, doch immun geworden sind, indem sie im Vergleiche zu geimpften Kontrolltieren gesund blieben. Wie diese Immunität aufzufassen sei, können wir vorderhand nicht entscheiden. Aus diesen Versuchen ergiebt sich nur, daß der bei Kaninchen, Hunden angenommene und begründete Mechanismus der Schutzimpfung nicht ohne weiteres eine Verallgemeinerung zuläßt.

Um zu sehen, ob diese Theorie der Schutzimpfung gegen Hundswut auch für den Menschen Geltung habe, war es notwendig den Nachweis zu erbringen, daß auch im Serum der nach Pasteur behandelten Menschen Schutzstoffe entstehen. Wenn auch Babes (6) in der Festschrift für Leyden es als eine feststehende Thatsache hinstellt, daß „das Blut immunisierter Menschen kräftiger immunisiert als jenes von Tieren“ und die Auffassung vertritt, daß die Schutzimpfung mittels Virus fixe so gedacht werden darf, „daß der Organismus hierdurch zur Bereitung antirabischen Serums angeregt wird“, so müssen wir demgegenüber behaupten, daß dieser Nachweis für den Menschen bisher nicht erbracht worden ist.

Die von Babes angeführten Versuche (Ann. de l'Inst. Past eur 1891), auf die sich Babes beruft, dürfen als Grundlage für die von Babes aufgestellte ;Theorie nicht herangezogen werden. In der erwähnten Arbeit von Babes und Cerchez (7) finden wir auf p. 632 diesbezüglich folgendes:

„Nous avons essayé une première application de ce moyen au traitement de 26 malades, mordus terriblement à la tête par un loup enragé. On sait quel chiffre élevé donnent les statistiques de M. Pasteur pour les morsures de ce genre. Partant de là, nous avons ajouté pour ces mordus, au traitement de M. Pasteur, le suivant: 12 d'entre eux, et notament les plus gravement mordus, ont reçu, en 4 ou 6 fois, une injection de 10 grammes de sang d'homme ou de chien immunisés. Le résultat a été très encourageant, car pendant le traitement je n'ai eu qu'un cas de mort parmi les personnes que j'ai vaccinées avec le sang. La seule personne, gravement mordue par ce même animal, qui ne soit pas venue a Bucarest pour se faire traiter, est morte de la rage.“

In der Anmerkung heißt es: „Deux garçons de laboratoire, Joa Jonescu et Georges Gal, attachés au service anti-rabique, et qui se sont fait vacciner plusieurs fois d'après notre méthode intensive, ont consenti à donner de leur sang, que nous avons retiré par des ventouses.“

Aus diesem Versuche allein, und andere Versuche finden wir in den Arbeiten von Babes nicht verzeichnet, läßt sich die Behauptung, daß im Serum immunisierter Menschen Schutzstoffe auftreten, nicht ableiten. Die von Babes behandelten Menschen bekamen neben menschlichem Serum auch noch Serum immunisierter Hunde. Trotzdem das Serum solcher immunisierten Hunde, wie aus den mitgeteilten Versuchen hervorgeht, im Versuche keine günstigen Resultate erzielt hat, läßt sich demselben ein geringer Schutzwert nicht gänzlich absprechen. Das menschliche Serum wurde von Babes vorher auf seinen Schutzwert im Tierversuche überhaupt nicht geprüft. Ist es denn nicht möglich, daß die günstigen Erfolge bei Menschen, über deren Dauer nach der Behandlung nicht berichtet wird, da in der Arbeit nur vom Erfolge, „pendant le traitement“, gesprochen wird, bloß auf die Wirksamkeit im Hundeserum zurückzuführen sind. Wir sehen also, daß diese Versuche nicht danach angethan sind, als Stütze für die aufgestellten Behauptungen Babes' zu dienen.

Nachdem außer dieser Arbeit keine weiteren Arbeiten über diese Frage vorliegen, so ist es wohl berechtigt, sagen zu dürfen, daß der Beweis für das Auftreten von Schutzstoffen nach der

Schutzimpfung nach Pasteur bei Menschen bisher noch nicht erbracht ist.

Unsere diesbezüglichen Versuche wurden in derselben Weise ausgeführt wie die Versuche an Tieren. Es wurde zunächst Blut von gesunden Menschen mit Einwilligung durch Aderlaß gewonnen und das auf seine rabicide Eigenschaft geprüft. Bei diesen und den folgenden Versuchen wurde dieselbe Methode der Prüfung angewendet.

Das frische Serum wurde in verschiedenen Mengen von 1 ccm bis 0,1 ccm auf 1 ccm einer aufs 100-fache verdünnten Gehirnemulsion des Virus fixe 24 Stunden bei Zimmertemperatur einwirken gelassen. Danach wurden davon ca. 0,2 ccm subdural Kaninchen injiziert. Als Testdosis nahmen wir deswegen eine so konzentrierte Lösung, um die uns aus den Tierversuchen bekannt gewordenen individuellen normalen Werte auszuschalten. Das Virus fixe ist nach unseren Versuchen noch in Verdünnungen von 1 : 1000 wirksam. Nachdem wir aber schon bei 500-fachen Verdünnungen Unregelmäßigkeiten im zeitlichen Auftreten, in der Dauer der Lyssaerkrankung beobachtet hatten, war es ebenfalls ein Grund, konzentriertere Emulsionen zur Auswertung der normalen und Immunsera zu verwenden. Da es auch in unseren Versuchen nicht darauf ankam, bloß den Nachweis zu führen, ob im Serum gesunder Menschen antirabische Stoffe nachweisbar sind, konnte diese große Testdosis, die gewisse kleine Werte an rabicider Substanz verdeckt, ohne weiteres verwendet werden. Die Testdosis wurde in der Weise hergestellt, daß das Gehirn der an Lyssa verendeten Kaninchen verrieben, emulgiert und entsprechend mit 0,6-proz. Kochsalzlösung verdünnt, durch steriles Papier filtriert wird. Diese filtrierte Emulsion des Virus fixe, die frei von gröberen Partikelchen ist, stellt uns die Testlösung dar.

Rabicidie des normalen menschlichen Serums.

Serum von Menschen	Menge in ccm	Virus fixe-Emulsion 1 : 100	Nach 24 Std. am	Subd. Kan. No.	Resultat
I	1,0	1,0	23. Mai	97	31. Lyssa 2. †
	0,5	1,0	23. „	107	30. „ 1. †
II	1,0	1,0	26. „	66	3. „ 4. †
	0,5	1,0	26. „	9	2. „ 4. †
	0,1	1,0	26. „	55	2. „ 4. †
III	0,1	1,0	9. Juni	275	17. „ 19. †
IV	0,5	1,0	8. „	222	16. „ 18. †
	0,1	1,0	8. „	210	22. „ 25. †
V	1,0	1,0	21. Juli	172	28. „ 29. †
	0,5	1,0	21. „	188	30. „ 1. †

(Einzelne dieser Sera wurden noch auf Virus fixe in 500facher Verdünnung geprüft.)

Serum von Menschen	Menge in ccm	Virus fixe-Emulsion 1 : 500	Nach 24 Std. am	Subd. Kan. No.	Resultat
III	0,5	1,0	9. Juni	297	17. Lyssa 19. †
	0,1	1,0	9. „	265	16. „ 17. †
	0,05	1,0	9. „	266	16. „ 18. †
IV	0,1	1,0	18. „	277	15. „ 17. †
	0,05	1,0	18. „	228	15. „ 17. †
VI	0,1	1,0	7. „	254	21. „ 22. †

Das Serum normaler Menschen besitzt somit kein rabicides Vermögen, denn Virus fixe (in Verdünnungen von 1:100) wird selbst in Mengen bis zu 1 ccm in seiner Wirksamkeit nicht beeinträchtigt.

Auch noch weitere Versuche in dieser Richtung, die später angeführt werden, führen zumeist zu demselben Resultate. Nur in 2 Fällen im folgenden Versuche waren Mengen von 1 ccm wirksam. Selbst Verdünnungen des Virus fixe von 1 : 500 werden vom normalen Serum in Mengen von 1,0 und 0,5 ccm nicht geschädigt.

Dieses Resultat steht in Uebereinstimmung mit den Erfahrungen der früher erwähnten Arbeit, in welcher gezeigt wurde, daß im normalen Serum von Kaninchen und Hunden in der Regel ebenfalls keine Schutzstoffe nachweisbar sind.

Wir gingen nun daran, zu untersuchen, ob im Serum von Menschen, die nach Pasteur gegen Tollwut behandelt sind, Schutzstoffe auftreten, die experimentell nachweisbar sind. Zu diesem Zwecke wurde Blut von Patienten der Lyssaanstalt, die ihre Einwilligung dazu gegeben haben, sofort nach der letzten Injektion daraufhin untersucht. Bei einem Falle konnte das Serum auch vor der Impfung auf Schutzstoffe untersucht werden. Bei den anderen Fällen wurde das Serum bloß nach der Impfung untersucht. Nachdem wir aber aus den Versuchen wissen, daß das Serum in Mengen von 1 ccm auf Virus fixe 1 : 100 nicht wirksam war, so konnten wir auf die vorherige Prüfung der Sera verzichten und innerhalb dieser bestimmten Grenzen das Serum auf seine Schutzkraft prüfen.

Die Behandlung nach Pasteur dauerte 14 Tage. Folgende Emulsionen des Virus fixe wurden täglich subkutan injiziert: 8 + 7-, 6-, 5-, 5-, 4-, 3-, 3-, 5-, 5-, 4-, 4-, 3-, 3- und 2-tägiges Mark je $^1/_2$ ccm in 3 ccm physiologischer Kochsalzlösung. Nach der letzten Impfung wurde sofort der Aderlaß gemacht und das Serum frisch untersucht.

Fall Holl. Blut vor und sofort nach der Impfung auf Virus fixe.

Menge in ccm	Virus fixe-Emulsion 1:100	Nach 24 Std. am	Subd. Kan. No.	Resultat
Vor der Impfung:				
1,0	1,0	26. Mai	56	2. Lyssa 4. †
0,5	1,0	26. „	60	2. „ 4. †
0,1	1,0	26. „	14	2. „ 4. †
Nach der Impfung:				
1,0	1,0	7. Juni	206	18. „ 19. †
0,5	1,0	7. „	278	14. „ 17. †
0,1	1,0	7. „	288	14. „ 16. †

Es enthält somit das Serum von Menschen sofort nach der 14-tägigen Impfung nach Pasteur gewöhnlich keine Schutzstoffe. Das Serum verhält sich ebenso wie normales Serum.

Dieses negative Ergebnis war für uns nicht überraschend. Wissen wir doch namentlich aus den Arbeiten von Tizzoni und Centanni, daß Schutzstoffe gegen Hundswut bei Tieren langsam entstehen sollen. Tizzoni und Centanni fanden die höchsten Werte erst am 20. Tage nach der letzten Impfung. Diese Versuchsergebnisse jedoch sind mit einer eigenen Methode und nicht mit der Methode der Schutzimpfung

Blut sofort nach der letzten Injektion (Virus fixe 1:100).

Serum von Menschen	Menge in ccm	Virus fixe-Emulsion 1:100	Nach 24 Std. am	Subd. Kan. No.	Resultat
2. Jurist	0,5	1,0	7. Juni	212	13. † ohne Erscheinung, davon subd. Kan. 212, am 26. Lyssa, 28. †
	0,2	1,0	5. „	60	11. Lyssa, 12. †
	0,1	1,0 (V. fix. 1:500)	5. „	70	12. „ 14. †
3. Messner	1,0	1,0	28. August	155	5.? 6. Lyssa, 8. †
	0,5	1,0	28. „	164	4. IX. Lyssa, 5. Lyssa, 7. †
	0,1	1,0	28. „	146	5. Lyssa, 6. Lyssa, 8. †
4. Coch	1,0	1,0	1. Septemb.	142	überlebt [1])
	0,5	1,0	5. „	338	14. Lyssa, 16. †
	0,1	1,0	1. „	175	11. Lyssa, 13. †

nach Pasteur gewonnen, so daß man sie nicht ohne weiteres mit den bei Menschen gewonnenen Resultaten vergleichen kann. Die folgenden Versuche an Kaninchen sollen deshalb als Ergänzung zu den an Menschen ausgeführten Versuchen zeigen, ob sofort nach der Schutzimpfung nach Pasteur Schutzstoffe auftreten oder nicht. Die Tiere wurden ebenso behandelt wie die Menschen und bekamen dieselben Mengen Virus. Nach der 14-tägigen Impfung wurde das Blut auf seinen rabiciden Wert untersucht. Die Prüfung geschah in der üblichen Weise. Nachdem wir aus früheren Versuchen die normalen Werte kannten, konnten wir auf die vorherige Prüfung des Serums verzichten.

Blut von Kaninchen sofort nach der Schutzimpfung.

Serum von Kaninchen	Menge in ccm	Virus fixe-Emulsion 1:100	Nach 24 Std. am	Subd. Kan. No.	Resultat
226	0,5	1,0	14. August	168	25. † ohne Erscheinungen
241	0,5	1,0	14. „	130	25. † „ „
	0,1	1,0	14. „	162	21. Lyssa, 23. †
170	0,5	1,0	14. „	112	überlebt
	0,1	1,0	14. „	163	24. Lyssa, 26. †
231	0,5	1,0	14. „	110	überlebt
	0,1	1,0	14. „	157	21. Lyssa, 23. †

Die Versuche lehren, daß bei Kaninchen bereits am 14. Tage nach der Impfung Schutzwerte, die dem normalen Serum erfahrungsgemäß nicht zukommen, auftreten können. Diese Werte sind allerdings gering, müssen immerhin aber als Immunwerte angesehen werden, da wir das normale Serum niemals in der Menge von 0,5 ccm rabicid gefunden haben.

Ob dieser Unterschied in den Ergebnissen der Tierversuche zu den an Menschen gewonnenen, in der Empfindlichkeit der Kaninchen für das Virus fixe oder in den relativ größeren Virusmengen, die zur Im-

1) Ob dieser Wert als Immunwert aufzufassen sein dürfte, ist nicht zu entscheiden, da das Serum vor der Impfung nicht untersucht wurde.

pfung der Kaninchen benutzt wurden, gelegen ist, müssen wir vorderhand unentschieden lassen.

Die Angaben von Tizzoni und Centanni, wonach die Schutzwerte des Serums am 20. Tage nach der Impfung ihr Maximum erreicht haben, ließen es wahrscheinlich erscheinen, daß die späteren Prüfungen vielleicht höhere Werte ergeben dürften. Das Blut dieser Kaninchen wurde aus diesem Grunde 10 Tage nach der Impfung einer abermaligen Prüfung unterzogen.

Blut von Kaninchen 10 Tage nach der letzten Imfung.

Serum von Kaninchen	Menge in ccm	Virus fixe-Emulsion 1:100	Nach 24 Std. am	Subd. Kan. No.	Resultat
226	0,1	1,0	25. August	145	überlebt
	0,05	1,0	25. „	185	„
241	0,1	1,0	25. „	159	3. Lyssa, 5. †
170	0,1	1,0	25. „	136	überlebt
	0,05	1,0	25. „	118	„
231	0,1	1,0	25. „	169	„
	0,05	1,0	25. „	111	„

Uebersichtstabelle über das rabicide Vermögen des Serums von Kaninchen vor und nach der Schutzimpfung.

Serum von Kaninchen	0,5 ccm	0,1 ccm		0,05 ccm
	Sofort nach der Impfung	Sofort nach der Impfung	10 Tage nach der Impfung	10 Tage nach der Impfung
226	+	θ	+	+
241	+	θ	θ	—
170	+	θ	+	+
231	+	θ	+	+

+ = wirksam, θ = unwirksam.

Die Zunahme der rabiciden Werte des Serums einige Zeit nach der Impfung ist durch diese Versuche nachgewiesen. Das Blut dieser Tiere, welches, sofort nach der letzten Impfung entnommen, bereits Schutzstoffe enthält, erweist sich einige Zeit nach der Impfung viel wirksamer.

Um die Frage, ob beim Menschen nach der Pasteur'schen Schutzimpfung Schutzstoffe entstehen, einwurfsfrei lösen zu können, war es nach dem eben Auseinandergesetzten unerläßlich, das Blut der Geimpften in einem späteren Zeitraume nach der Impfung daraufhin zu untersuchen. Das war nun bei den im Institute behandelten Fällen unmöglich, da die Leute sofort nach der Impfung entlassen werden. Dadurch, daß wir uns selbst der Schutzimpfung unterzogen haben und durch die Bereitwilligkeit mehrerer Kollegen war es uns ermöglicht, diese Untersuchungen, die einige Aderlässe erforderten, auszuführen. Diesen Herren sprechen wir auch an dieser Stelle unseren besten Dank aus.

Die Impfung nach Pasteur wurde ebenso ausgeführt wie bei den gebissenen Menschen. Das mittels Aderlaß gewonnene Blut wurde zuerst vor der Impfung, dann 18—22 Tage nach der letzten Impfung untersucht.

Dr. H.

Serummenge in ccm	Virus fixe-Emulsion 1:100	Nach 24 Std. am	Subd. Kan. No.	Resultat
Vor der Impfung:				
1,0	1,0	23. Mai	53	4. Lyssa, 5. †
0,5	1,0	23. „	63	30. „ 31. †
0,1	1,0	23. „	115	2. „ 3. †
18 Tage nach der letzten Impfung:				
1,0	1,0	3. Juli	271	21. † ohne Erscheinung, davon subd. Kan. 271 3. Lyssa, 4. †
0,5	1,0	3. „	234	14. Lyssa, 16. †
0,1	1,0	3. „	201	13. „ 14. †
Dr. St.				
Vor der Impfung:				
1,0	1,0	22. Mai	48	30. Lyssa, 1. †
0,5	1,0	22. „	57	29. „ 31. †
0,1	1,0	22. „	50	29. „ 31. †
22 Tage nach der letzten Impfung:				
1,0	1,0	28. Juni	272	6. † ohne Erscheinung, davon subd. Kaninchen überlebt
0,5	1,0	28. „	233	überlebt
0,1	1,0	28. „	248	8. † ohne Erscheinung, davon subd. Kaninchen überlebt
0,05	1,0 (V. fixe 1:500)	28. „	230	überlebt
Dr. W.				
Vor der Impfung:				
1,0	1,0	22. Mai	94	29. Lyssa, 1. †
0,5	1,0	22. „	82	29. „ 1. †
0,1	1,0	22. „	1	30. „ 1. †
22 Tage nach der letzten Impfung:				
1,0	1,0	28. Juni	263	überlebt
0,5	1,0	28. „	261	überlebt
0,1	1,0	28. „	223	7. Lyssa, 8. †
0,5	1,0 (V. fixe 1:500)	28. „	270	überlebt
0,1	1,0 (V. fixe 1:500)	28. „	274	7. Lyssa †
Dr. Krl.				
Vor der Impfung:				
1,0	1,0	22. Mai	54	überlebt
0,5	1,0	22. „	80	31. Lyssa, 3. †
0,1	1,0	22. „	22	29. „ 1. †
22 Tage nach der letzten Impfung:				
0,5	1,0	28. Juni	291	15. VII. nach 18 Tagen † ohne Erscheing., subd. Kaninchen überlebt
0,1	1,0	28. „	217	überlebt
0,1	1,0 (V. fixe 1:500)	28. „	219	„
0,05	1,0 (V. fixe 1:500)	28. „	257	„

Serummenge in ccm	Virus fixe-Emulsion 1:100	Nach 24 Std. am	Subd. Kan. No.	Resultat
		Dr. Krs.		
Vor der Impfung:				
1,0	1,0	22. Mai	35	überlebt
0,5	1,0	22. „	61	29. Lyssa, 31. †
0,1	1,0	22. „	83	31. „ 2. †
22 Tage nach der letzten Impfung:				
0,5	1,0	28. Juni	284	5. † ohne Erscheinung, subd. Kan. 184 † am 31. VI., davon subd. Kaninchen überlebt
0,1	1,0	28. „	255	8. Lyssa, 9. †

Uebersichtstabelle über das rabicide Vermögen des menschlichen Serums vor und nach der Pasteur'schen Schutzimpfung.

Serum des	1,0 ccm		0,5 ccm		0,1 ccm	
	Vor der Impfung	22 Tage nach der Impfung	Vor der Impfung	22 Tage nach der Impfung	Vor der Impfung	22 Tage nach der Impfung
Dr. H.	θ	θ	θ	θ	θ	θ
„ St.	θ	+	θ	+	θ	+
„ W.	θ	+	θ	+	θ	θ
„ Krl.	+	+	θ	+	θ	+
„ Krs.	+	+	θ	+	θ	θ

θ = unwirksam, + = wirksam.

Zunächst geht aus diesen Versuchen, sowie aus den früher angeführten hervor, daß das normale Serum von Menschen in Mengen von 1,0—0,1 für gewöhnlich nicht imstande ist, Virus fixe in 100-facher Verdünnung unschädlich zu machen. Nur in 2 Fällen gelang es, die angewandte Giftdosis 1 ccm Serum zu zerstören. Da in der größeren Zahl der Fälle dieser Wert sich als unwirksam erwies, so dürfen wir ohne weiteres sagen, daß normales menschliches Serum in Mengen von 1 ccm unsere Testdosis nicht zu beeinflussen vermag. Im Serum schutzgeimpfter Menschen fanden sich Immunstoffe (rabicide Substanzen) allerdings erst einige Zeit (18—22 Tage) nach der letzten Impfung.

Weiter geht hervor, daß der Gehalt des Serums an rabiciden Substanzen in den untersuchten Fällen trotz der gleichen Behandlungsmethode verschieden ist. Wir sehen also auch hier wie bei den Tierversuchen und auch bei den anderen künstlichen Immunisierungen, daß das individuelle Moment die Entstehung und die Menge der Immunsubstanzen zu beeinflussen scheine. Wir erfahren ähnliches bei der Immunisierung mit Toxinen, Bakterien, Blutkörperchen, Eiweißsubstanzen etc., überall spielt das individuelle Verhalten eine Rolle. In einem Falle (H.) sehen wir sogar, daß das Serum in seinem Mangel vor und eine Zeit lang nach der Behandlung frei von Immunsubstanzen geblieben ist. Ob bei Anwendung größerer Serummengen irgendwelche Werte zu Tage getreten wären, müssen wir unentschieden lassen. Jedenfalls beweist dieser Fall ganz eklatant, daß wir auch hier mit der individuellen Verschiedenheit

in Bezug auf die Produktion von Immunsubstanzen zu rechnen haben. — Die Kenntnis dieser Thatsache, daß nämlich nach der Schutzimpfung nach Pasteur nicht in jedem Falle entsprechende Werte an Schutzstoffen auftreten müssen, dürfte vielleicht von einer gewissen Bedeutung sein. Daß es Todesfälle an Wut trotz der regelrecht durchgeführten Behandlung nach Pasteur giebt, ist eine bekannte Thatsache. Wodurch diese Todesfälle bedingt sind, dafür hat man bisher keine sicheren Anhaltepunkte gewonnen. Den Ort der Verletzung, also Kopf- und Gesichtsbisse, die allerdings das größere Kontingent der Todesfälle liefern, allein hierfür verantwortlich zu machen, geht deswegen nicht an, da auch Fälle mit Bißwunden an anderen Körperstellen trotz Behandlung an Lyssa starben.

Abgesehen, daß Virulenzgrad und Menge des in die Wunde gelangten Virus hierbei auch eine bedeutende Rolle spielen, ließe sich vielleicht für einige Todesfälle die Ursache des Mißerfolges auch darin finden, daß gerade das betreffende Individuum auf die Immunisierung mit Virus fixe nicht entsprechend reagiere und keine nennenswerten Mengen von rabicider Substanz produziere. Wenn wir diese Annahme auch nicht beweisen können, wäre die Möglichkeit doch nicht absolut von der Hand zu weisen. Folgender an der Schutzimpfungsanstalt beobachteter Fall könnte in diesem Sinne gedeutet werden:

M. P., 35 Jahre alt, wurde am 29. Dezember von einem wutkranken Hunde gebissen. Am 31. Dezember erfolgte die Aufnahme in die Anstalt. Man konstatierte am linken Handrücken eine hellerstückgroße, oberflächliche Exkoriation. Nach 14-tägiger Impfung wird Patientin am 13. Januar aus der Behandlung entlassen. Am 30. April erkrankt sie unter Symptomen der Lyssa. Am 1. Mai Exitus. Die Verimpfung der Medulla ergab ein positives Resultat. Aus der Leiche entnommenes Blut schied geringe Mengen Serum aus, das zu folgendem Versuche verwendet wurde:

Menge des Serums (postmortal)	Virus fixe-Emulsion 1:100	Nach 24 Stdn. am	Subd. Kaninch. No.	Resultat
0,5	1,0	6. Mai	140	12. Lyssa, 14. †
0,1	1,0	6. „	207	12. „ †
0,05	1,0	6. „	46	12. „ 13. †

Ob Schutzstoffe sofort nach der Impfung vorhanden waren oder ob überhaupt keine Immunität eingetreten ist, läßt sich jetzt nicht mehr feststellen. Um diesen Fall dennoch verwerten zu können, war es vor allem notwendig, nachzuweisen, ob die künstliche Immunität nach der

Prüfung der Sera (H., St., Krl., Krs.) 85 Tage nach der Schutzimpfung.

Serum	Menge in ccm	V. fixe-Emulsion 1:100	Nach 24 Std. am	Subd. Kan. No.	Resultat
Dr. H.	1,0	1,0	1. September	123	überlebt
	0,5	1,0	4. „	138	13. Lyssa, 15. †
Dr. St.	0,5	1,0	4. „	116	überlebt
	0,1	1,0	4. „	199	„
Dr. Krl.	0,5	1,0	4. „	148	„
	0,1	1,0	4. „	165	„
	0,05	1,0	1. „	151	„
Dr. Krs.	0,5	1,0	1. „	167	14. Lyssa
	0,1	1,0	4. „	134	12. „ 14. †

Schutzimpfung von längerer Dauer ist. Es war daher angezeigt, das Serum der geimpften Fälle nach einem längeren Zeitraume nach der Impfung noch einmal zu prüfen, um zu erfahren, ob die Schutzstoffe und ihre Werte sich irgendwie geändert haben. Es wurde daher das Serum bei den schutzgeimpften Versuchspersonen 85 Tage nach der Impfung neuerdings auf seine Wirksamkeit untersucht. Das Blut wurde durch Aderlaß gewonnen und das Serum frisch untersucht.

Diese Versuche zeigen zunächst, daß die rabiciden Substanzen nach einigen Monaten im Organismus im Werte konstant bleiben können. Im Falle H. finden wir sogar einen Immunwert, der sich 18 Tage nach der Impfung nicht nachweisen ließ. Also auch dieser Fall beweist, daß die Schutzstoffe lange Zeit nach der Impfung noch nachweisbar sind. Gleichzeitig geht aus diesen Versuchen hervor, daß die rabiciden Substanzen mit der Zeit aus dem Blute wieder verschwinden können. Im Falle Krs. hatte das Serum 22 Tage nach der Impfung einen Wert von 0,5 ccm und diese Mengen reichten im letzten Versuche nicht mehr aus, dieselbe Testdosis zu zerstören.

Danach erscheint es zulässig, die negativen Ergebnisse, gewonnen mit dem Serum der gestorbenen M. P., darauf zurückzuführen, daß geringwertige Schutzstoffe, wie im Falle Krs., nach der Impfung aufgetreten sind und daß die Immunstoffe bald nach der Impfung verloren gehen. (In den Fällen St. und Krl., welche 22 Tage nach der Impfung ziemlich hohe Werte aufweisen, haben sich selbe nach 85 Tagen unverändert erhalten.) Ob der tödliche Ausgang mit dem Mangel an Schutzstoffen überhaupt in Zusammenhang gebracht werden kann, läßt sich vorderhand nicht bestimmen. Weitere Untersuchungen in dieser Richtung und entsprechende Tierversuche werden darüber Klarheit verschaffen. Die Lösung dieser Frage hat ja nicht nur theoretisches Interesse, sondern ist auch in praktischer Hinsicht von Wichtigkeit. Würden die Versuche thatsächlich ergeben, daß trotz Schutzimpfung bei manchen Menschen nur sehr geringwertige Schutzstoffe auftreten und bald verschwinden und daß die Mißerfolge der Schutzimpfung darauf zurückzuführen wären, dann müßte die Methode der Schutzimpfung entsprechend geändert werden.

Aber auch noch in anderer Richtung scheinen die Versuche danach angethan zu sein, auf die von Pasteur inaugurierte Schutzimpfung einiges Licht zu werfen.

Die mitgeteilten Versuche, zusammengehalten mit den früheren Tierversuchen, gestatten es, die bereits entwickelten Vorstellungen über die Schutzimpfung aufrecht zu erhalten und auf die Menschen auszudehnen. Wir sind berechtigt anzunehmen, daß die Immunisierung mit dem Virus fixe in den bestehenden präventiven Impfungen gegen Cholera, Pest, Typhus etc. ihr Analogon findet. Diese Theorie deckt sich mit der von Marx, Babes aufgestellten; wie wir aber bereits darauf hinwiesen, haben weder Marx noch Babes ihre Vorstellungen von der Schutzimpfung durch solche Untersuchungen begründet.

Schlußfolgerungen.

I. Die Schutzimpfung nach Pasteur ist eine aktive Schutzimpfung wie die mit bekannten Erregern.

II. Im Blutserum gesunder Menschen sind in der Regel keine Schutzstoffe gegen das Virus der Hundswut nachzuweisen.

III. Das Serum der Menschen enthält sofort nach erfolgter Schutzimpfung nach Pasteur keine Schutzstoffe.

IV. Am 22. Tage nach vollendeter Schutzimpfung lassen sich im Serum geimpfter Menschen sicher Schutzstoffe gegen das Wutvirus nachweisen; doch variieren sie bei verschiedenen Menschen in ihren Werten.

V. Die Schutzstoffe lassen sich auch längere Zeit nach erfolgter Impfung nachweisen.

VI. Einzelne Mißerfolge der Schutzimpfung nach Pasteur konnten in der ungenügenden Produktion der Immunsubstanzen ihre Ursache haben.

Litteratur.

1) Babes und Lepp, Annal. de l'Inst. Pasteur. 1889.
2) Tizzoni e Centanni, Modo di preparare siero antirabico. Bologna (Gamberlini e Paruseggiani) 1895.
3) Kraus, R., Keller, E. und Clairmont, P., Zeitschr. f. Hyg. 1902.
4) Marx, Deutsche med. Wochenschr. 1900.
5) Kraus, R. und Maresch, R., Zeitschr. f. Hyg.
6) Babes, Internat. Beitr. z. inneren Med. Bd. I. 1902.
7) Babes und Cerchez, Annal. de l'Inst. Pasteur. 1891.

Ueber Streptokokkensera[1].

Von Dr. **Piorkowski.**

Auf dem Gebiete der Blutserumtherapie ist noch immer als eines der am schwierigsten zu bearbeitenden Themen die Lösung der Frage über die Streptokokkeninfektionen und deren Heilung betrachtet worden.

Heißer denn je ist augenblicklich der Streit der Meinungen entbrannt über das pro et contra der Einheitlichkeit der verschiedenen Streptokokkenarten. Eine Klärung der Ideen ist noch nicht erfolgt und voraussichtlich wird sich noch mancher Kongreß mit ihnen zu beschäftigen haben. Soeben haben wir von dem Moser'schen Scharlachserum gehört, das die Spezifität der Scharlachstreptokokken zur Voraussetzung hat. Ueber die Sera von Menzer und Aronsohn sind gleichfalls erst Erfahrungen zu sammeln. Von den vielen anderen Sera, mit deren Herstellung sich Behring, v. Lingelsheim, Petruschky u. A. beschäftigt haben, verdienen noch besonders hervorgehoben zu werden diejenigen von Marmorek und Tavel, die in engeren Grenzen einwandsfreie Resultate zu liefern imstande sind, in praxi aber häufig im Stiche lassen. Es steht jetzt ziemlich fest, daß es sich bei den verschiedenen Streptokokkenrassen um Gruppenreaktionen handelt, und zwar gehören zu der einen Gruppe die Streptokokken, die bei Anginafällen gefunden werden, in eine zweite die pyogenen, bei Menschen auftretenden Arten, in eine dritte die Streptokokken der Pferdedruse. Morphologisch und kulturell gleichen sich alle diese Mikroben.

Als einen kleinen Beitrag zu dem großen Kapitel der Streptokokkeninfektionen und deren Heilung, der gleichzeitig Schlüsse auf die strenge Spezifizierung der Arteinheit zuläßt, mögen die Erfahrungen dienen, die

---

1) Nach einem Vortrage, gehalten auf dem 74. Kongresse deutscher Naturforscher und Aerzte in Karlsbad.

ich im Laufe der Jahre gesammelt habe bei einem Serum, das ich im Verein mit Herrn Kreistierarzt Dr. Jess herstelle. Es ist dies ein Schutz- und Heilserum für die Pferdedruse, einer kontagiösen, fieberhaften, eiterig katarrhalischen Affektion der Nasenschleimhaut und des Rachens, welche meist zur Abscedierung der Kehlgangs- oder der retropharyngealen Lymphdrüsen führt. Im frischen Eiter findet man hierbei sehr lange, gewundene Streptokokken, welche, durch das Plattenverfahren isoliert, für die jedesmaligen Injektionszwecke stets von neuem reingezüchtet werden müssen, um virulent für die Serumbereitung verwendet werden zu können.

Zur Herstellung des Serums eignen sich am besten große Haustiere, namentlich Pferde, die in der üblichen Weise allmählich gesteigerte Dosen injiziert erhalten. Dieses Serum, durch Tierversuche an Mäusen und durch das Agglutinationsphänomen geprüft, zeichnet sich durch hochgradige Wertigkeit aus, resp. wird es erst für Immunisierungszwecke verwendet, wenn seine Titerstellung für hochgradig genug befunden worden ist. Die Entnahme des Blutes aus der Vena jugularis darf nicht durch zu späten Termin verzögert werden. Die bei verschiedenen Remontedepots und einer großen Zahl in Privatbesitz befindlicher Pferde ausgeführten Versuche haben bisher recht gute Erfolge gezeitigt. Es muß darauf hingewirkt werden, möglichst hohe Werte zu schaffen, so daß kleine Dosen verwendet werden können. Bei dem Drusestreptokokkenserum genügt meist eine Injektion von 10 ccm; für Heilzwecke muß die Dosis je nach der Ausbreitung der Krankheit eventuell verdoppelt oder verdreifacht werden. Diese Gaben haben sich bei kräftigen Tieren als ausreichend erwiesen. Allerdings war eine Komplementierung durch Normalserum notwendig erschienen und es wird darum neben Immunserum auch Normalserum appliziert.

Für die Differenzierung der Streptokokkenarten war das Agglutinationsphänomen (Verdünnung bis zu 100 und mehr) am besten zu verwerten, zum Teil auch das Wachstum in Serum oder in frischen Kulturen anderer Arten. Die sehr virulenten Drusestreptokokken agglutinieren solche von Anginen wenig oder gar nicht; andere pyogene Arten nur teilweise, bis zu einer 25-fachen Verdünnung.

Schutzimpfung durch Anthrakase-Immunproteïdin gegen Milzbrand.

Von Prof. Dr. **Rudolf Emmerich.**

In einer von Prof. Dr. Oscar Löw [1]) und mir in der Zeitschr. f. Hyg. (Bd. XXXVI. p. 9 etc.) veröffentlichten Abhandlung wurde bereits mitgeteilt, daß die Milzbrandbacillen in geeigneten Nährflüssigkeiten ein bakteriolytisches Enzym, die Anthrakase, erzeugen, welches durch Digerieren seiner Lösungen mit 0,3 Proz. kohlensaurem Kali und zerkleinerter Milzmasse in eine hochmolekuläre und deshalb im Tierkörper haltbare Eiweißverbindung (Anthrakase - Immunproteïdin) übergeführt

1) Emmerich, R. und Löw, O., Die künstliche Darstellung der immunisierenden Substanzen (Nukleasen-Immunproteidine) und ihre Verwendung zur Therapie und Schutzimpfung.

werden kann. In der folgenden Abhandlung, welche Herr Dr. Thönnessen mit mir gemeinschaftlich fertiggestellt hat, werden nun Beweise dafür erbracht, daß durch zwei- oder mehrmalige subkutane Injektion von genügenden Mengen Anthrakase-Immunproteïdin sofort eine hochgradige Immunität von Kaninchen und Schafen gegen Milzbrand sicher erzielt werden kann. Wenn bei den im Folgenden mitgeteilten Immunisierungsversuchen einige kein vollständig positives Resultat ergeben haben, so war dies nur darin begründet, daß die injizierte Flüssigkeit ungenügende Mengen von Anthrakase-Immunproteïdin enthielt.

Bei Anwendung des Präparates in der tierärztlichen Praxis wird man eine sichere immunisierende Wirkung garantieren können, wenn dasselbe einer einfachen Prüfung in der Weise unterstellt wird, daß man ermittelt, wie viel Milzbrandbacillen bei Aussaat einer stets annähernd gleichen Zahl derselben von 1 ccm Anthrakase-Immunproteïdinlösung in einer bestimmten Zeit unter anaëroben Verhältnissen, wie sie ja auch im Tierkörper gegeben sind, vernichtet werden.

Die Therapie und Schutzimpfung durch Anthrakase-Immunproteïdin hat, wie wir schon früher[1]) mitgeteilt haben, gegenüber der Anwendung von Heilserum erhebliche Vorteile. Ein sehr wesentlicher Vorzug der Schutzimpfung durch Anthrakase-Immunproteïdin ist die Unschädlichkeit der Herstellung des Impfstoffes und der Ausführung der Schutzimpfungen für den Fabrikanten und die Aerzte oder Tierärzte, sowie für Assistenten oder Diener. Dagegen ist die Immunisierung der zur Serumgewinnung bestimmten Tiere gegen Anthrax mit großer Gefahr für die Experimentatoren verbunden. Die oft wiederholten subkutanen oder intravenösen Injektionen von Anthraxbacillen, welche in der letzten Periode der künstlichen Immunisierung hochvirulent sein müssen, werden sich als eine höchst unheimliche Arbeit erweisen, zumal sehr große Mengen von bacillenhaltiger Kultur injiziert werden müssen. Der Arzt oder Tierarzt, welcher die Injektionen ausführt, oder die Diener, welche ihm dabei behilflich sind, indem sie die Spritzen füllen, oder mit Spritze und Hohlnadeln beim Auskochen etc. hantieren, können sich leicht infizieren.

Die Zahl der Bakteriologen, welche sich bei Versuchen an Tieren mit Anthrax infiziert haben, ist bekanntlich eine recht große. Aber auch bei Dienern und dem Wartepersonal von Versuchstieren sind schon öfters Milzbrandinfektionen vorgekommen. Vor einigen Jahren infizierte sich in einer Universitätsstadt Deutschlands ein Diener, welcher bei der Ausführung von Milzbrandbacilleninjektionen behufs Immunisierung von Schafen assistierte, mit Milzbrand und starb daran.

Noch größer ist die Gefahr, wenn bei Ausführung der Schutzimpfungen kleinere oder größere Mengen von Kultur auf das Fell der Versuchstiere oder in die Umgebung gelangen, was trotz der größten Sorgfalt mitunter vorkommt. Es sind derartige Fälle bekannt geworden, bei welchen Milzbrandepidemieen in den betreffenden Versuchsställen entstanden sind. Es ist nur dem Zufall zu verdanken, wenn in solchen Fällen die Ursache der Epidemie alsbald erkannt wird, bevor sich Infektionen des Wartepersonals ereignet haben.

Es scheint, daß das Anthrakase-Immunproteïdin nur unter anaëroben Bedingungen Anthraxbacillen vernichtet. Diesbezügliche Untersuchungen, sowie solche über die vermutliche Enzymnatur der Anthrakase werden von anderer Seite baldigst veröffentlicht werden.

---

1) Zeitschr. f. Hygiene etc. Bd. XXXVI. p. 9 etc.

Darstellung des Anthrakaseimmunproteïdin und dessen immunisierende Wirkung gegen Milzbrand.

Von **Josef Thönnessen.**

Gegen Ende des Jahres 1899 veröffentlichten Prof. Dr. Emmerich und Prof. Dr. Löw[1]) zum ersten Male ihre geistvolle Theorie über die Abhängigkeit der erworbenen Immunität von bakteriolytischen Enzymen, hierbei ausgehend von der Beobachtung, daß gewisse Bakterien, z. B. der Bac. pyocyaneus, in Flüssigkeitskulturen aufgelöst werden, sobald sich das bakteriolytische Enzym, die Pyocyanase, in größerer Menge in den Kulturen angehäuft hat. Eine feste experimentelle Grundlage schufen sie daneben einerseits durch ihre ausgedehnten Untersuchungen über die auflösende Wirkung des Pyocyaneus-Enzyms auf Milzbrand-, Typhus-, Diphtherie-, Pestbacillen u. s. w., andererseits durch Versuche über die heilende Wirkung der Pyocyanase bei Milzbrand resp. die immunisierende Wirkung des Pyocyanaseimmunproteïdins gegen Milzbrand und Diphtherie. Ohne Zweifel sind diese Ausführungen gerade für den Neuling auf bakteriologischem Gebiete, der sich beim Studium der Immunitätsfrage zum ersten Mal in dem Labyrinthe von Hypothesen, Theorieen und Gegentheorieen verirrt hat, gerade wegen ihrer Klarheit und Einfachheit höchst anziehend und plausibel. So ergriff auch ich mit Freuden die Gelegenheit, unter Leitung von Herrn Prof. Emmerich einen kleinen Beitrag zur weiteren, experimentellen Begründung der Enzymtheorie der Immunität zu liefern.

Da makroskopisch beobachtet werden konnte, daß auch in Flüssigkeitskulturen des Bacillus des Schweinerotlaufes im Laufe von Wochen und bei öfterem Schütteln ein völliges Verschwinden des am Boden der Kulturen liegenden Bakteriensedimentes eintritt und ähnliches, wenn auch nicht in gleicher Vollständigkeit, bei Milzbrand-, Cholerabacillen-Kulturen u. s. w. zu konstatieren war, so hielten Emmerich und Löw sich berechtigt, anzunehmen, daß wenigstens in den Flüssigkeitskulturen der Gelatine peptonisierenden pathogenen Bakterien ebenfalls bakteriolytische Enzyme gebildet werden. Um für die Richtigkeit dieser Annahme thatsächliche Beweise zu erbringen, suchte ich unter Leitung des Herrn Prof. Emmerich zunächst aus Flüssigkeitskulturen des Milzbrandbacillus das bakteriolytische Enzym zu gewinnen und dessen heilende Wirkung, sowie die immunisierende Fähigkeit der Eiweißverbindung dieses Enzyms zu untersuchen.

Gemäß der von beiden obengenannten Autoren inaugurierten Nomenklatur war dieses präsumptiv angenommene Enzym als Anthrakase zu bezeichnen resp. nach seiner Ueberführung in eine höhere stabilere Eiweißverbindung als Anthrakaseimmunproteïdin.

I. Darstellung des Anthrakaseimmunproteïdin.

Bezüglich der Darstellung des Anthrakaseimmunproteïdin kann ich mich hier auf die nötigsten Angaben beschränken, da erst vor kurzem

1) Zeitschr. f. Hyg. Bd. XXXI. p. 1—66.

eine eingehende und erschöpfende Abhandlung über dieses Verfahren von Emmerich und Löw[1]) erschienen ist.

Zunächst handelte es sich darum, zu ermitteln, welche Nährlösung die üppigste Entwickelung der Milzbrandbacillen ermöglicht. Die hierauf gerichteten Untersuchungen ergaben, daß bei folgender Zusammensetzung:

Aqu. destillat.	1000,0 ccm
Asparagin	2,0 g
Pepton sicc.	5,0 „
Dikaliumphosphat	2,0 „
Chlornatrium	2,0 „
Natrium bicarbonic.	1,0 „
Magnesiumsulfat	0,1 „

ein sehr üppiges Wachstum der Bakterien einsetzt mit wolkiger Trübung, auf welche bald eine starke Sedimentbildung folgt.

Das Dikaliumphosphat des Handels muß mit Kalilösung neutralisiert werden; das Magnesiumsulfat darf erst nach dem Sterilisieren und Erkalten zugesetzt werden. Späterhin hat es sich als zweckmäßig erwiesen, dieser Nährlösung noch Bouillon zuzusetzen, da hierdurch das Wachstum der Bakterien erheblich befördert wird.

Obige Nährlösung wurde in einer Menge von 8 l auf 10 große Glaskolben verteilt und in dieselbe eine, durch wiederholte Tierpassage hochvirulent gemachte Milzbrandbacillenkultur in großer Menge eingeimpft (auf jeden Kolben nahezu eine 24 Stunden alte Kultur auf schief erstarrtem Agar)[2]). Die nächsten 3—4 Tage werden die Kolben bei 22° C, dann bei 37° C geführt. Während der ersten Wochen zeigt sich auf dem Grunde der Gefäße ein mächtiger Bodensatz in Form flockiger Massen, welche bei leichtem Schütteln langausgezogene zusammenhängende Fäden bilden. Nach 4 Wochen werden die Kolben herausgenommen, die obenstehende, fast klare Flüssigkeit vom zurückbleibenden Sedimente abgegossen, durch Berkefeld-Filter filtriert, im Vakuum auf etwa $^1/_{10}$ des Volumens eingedampft und gegen Leitungswasser dialysiert. Um nun die in konzentrierter Form erhaltene Anthrakase in das höher zusammengesetzte und haltbarere Anthrakaseimmunproteïdin überzuführen, wurde frische zerkleinerte Schweinemilz (zu 1 l Flüssigkeit 30 g) und 0,3 Proz. kohlensaures Kali hinzugefügt. Schon in kurzer Zeit trat infolge beginnender Auflösung eine Zusammenballung und Verschleimung der einzelnen, feinen Milzpartikelchen zu einem einzigen, zähschleimigen Klumpen ein. Diese Erscheinung berechtigt nach den Erfahrungen von Emmerich und Löw zu der Annahme, daß reichliche Mengen proteolytischen Enzyms in Lösung sind. Das Anthrakaseimmunproteïdin stellte in seiner damaligen Form eine dunkelbraunrote Flüssigkeit dar, die, um Zersetzungen hintanzuhalten, noch mit 0,2 Proz. Trikresol versetzt und im Eisschrank aufbewahrt wurde.

II. Immunisierungsversuche gegen Milzbrand durch Anthrakaseimmunproteïdin.

a) Immunisierung von Kaninchen.

29. April 1900. Zum ersten Immunisierungsversuch wurde Kaninchen I weiß (2560 g schwer) bestimmt. Dasselbe erhält

1) Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. Bd. XXXVI. p. 10—28.

2) Es ist wahrscheinlich, daß eine nicht oder nur wenig virulente Kultur ebenso gut oder noch besser zur Darstellung der Anthrakase ist.

2 ccm Anthrakaseimmunproteïdin
2. Mai 6 „ „
4. „ 10 „ „
6. „ 2 „ „ subkutan
und 4 „ „ intravenös

I. Versuch.

7. Mai. Kaninchen I und Kontrolltier (graubraun, 2433 g schwer) werden mit je 1 ccm Bouillonaufschwemmung einer hochvirulenten Milzbrandagarkultur subkutan infiziert.

9. Mai. Kontrolltier ist 41 Stunden nach der Infektion verendet. Sektion ergiebt sehr starkes, sulziges Oedem an der Injektionsstelle und an der Bauchhaut; Milz vergrößert, mit massenhaften Bacillen. Kaninchen I zeigt keine krankhaften Veränderungen, ist auch nach 4 Wochen völlig gesund.

Zu weiteren Versuchen werden 3 kräftige Kaninchen bestimmt:

Kaninchen II, braunrot, 4155 g schwer
„ III, weiß, 2300 „ „
„ IV, braun, 4000 „ „

Sämtliche Tiere erhalten am

8. Mai je 4 ccm Anthrakaseimmunproteïdin
11. „ „ 6 „ „
14. „ „ 7 „ „
16. „ „ 7 „ „

subkutan.

II. Versuch.

19. Mai. Kaninchen II und Kontrolltier (4030 g) werden mit je 1 ccm Bouillonaufschwemmung hochvirulenter Milzbrandkultur infiziert (Keimzahl 297 990). Kaninchen II erhält außerdem noch 2 ccm Anthrakaseimmunproteïdin subkutan und 2 ccm intravenös.

21. Mai. Kaninchen II ist munter und frißt gut. Kontrolltier verendet 43 Stunden nach der Infektion. Sektion ergiebt typischen Befund mit massenhaften Bacillen im Blute. Kaninchen II zeigt auch an den folgenden Tagen und Wochen keinerlei krankhafte Erscheinungen; dasselbe bleibt am Leben.

Die Injektionen von Anthrakaseimmunproteïdin übten niemals weder lokal auf die Impfstelle noch auf das Allgemeinbefinden der Tiere irgend eine üble Wirkung aus. Vielmehr nahmen die meisten Tiere während der Behandlung mit Anthrakaseimmunproteïdin an Gewicht zu und niemals zeigte sich an der Injektionsstelle eine entzündliche Infiltration oder gar Absceßbildung.

24. Mai. Kaninchen III und IV erhalten
je 8 ccm Anthrakaseimmunproteïdin
28. „ „ 8 „ „
subkutan.

III. Versuch.

31. Mai. Kaninchen III (2210 g) und Kontrolltier (2130 g) werden mit je 1 ccm Bouillonaufschwemmung einer virulenten Milzbrandkultur infiziert (Keimzahl 726 800).

1. Juni. Beide Tiere ruhig und ohne Freßlust.

2. Juni. Die Impfstelle ist bei dem Kontrolltier stark infiltriert, bei Kaninchen III ohne Infiltration.

Kontrolltier verendet abends, 52 Stunden nach der Infektion. Sektion ergiebt ein ungewöhnlich starkes Oedem, ausgedehnt über den ganzen Bauch und Brust; Darmwand injiziert; Milz vergrößert. Kaninchen III wird bald wieder munter und frißt gut. 8 Tage später wiegt es 2300 g, hat also trotz der schweren Infektion an Gewicht zugenommen. Auch in den nächsten Wochen sind keine krankhaften Erscheinungen sichtbar. Das Tier bleibt gesund (Beobachtungszeit 3 Monate).

9. Juni. Nachdem nur mehr Kaninchen IV zu Versuchszwecken zur Verfügung steht, werden 2 neue Tiere hinzugenommen.

Kaninchen V, graubraun (2620 g) und Kaninchen VI, braun (2730 g). Beide erhalten

je 1 ccm Anthrakaseimmunproteïdin
12. Juni „ 2 „ „
15. „ „ 4 „ „

subkutan.

IV. Versuch.

22. Juli, 4 Uhr nachmittags:
Kaninchen IV (4310 g)
„ V (3150 g)
„ VI (3060 g)
Kontrolltier (3350 g)

werden mit je 1 ccm Bouillonaufschwemmung hochvirulenten Milzbrandes (Sobernheim) infiziert. Die Kultur stammte aus Halle und hatte bei einem Probeversuch das Tier innerhalb 31 Stunden getötet. Außerdem erhält Kaninchen VI noch 4 ccm Anthrakaseimmunproteïdin subkutan.

23. Juni. Sämtliche Tiere zeigen sich noch wenig affiziert.

24. Juni. 6 Uhr abends verendet das Kontrolltier 50 Stunden nach der Infektion. Sektion ergiebt starkes Oedem der Impfstelle und Bauchhaut etc.

25. Juni. 8 Uhr morgens verendet Kaninchen V 64 Stunden nach der Infektion. Sektion zeigt ein nur auf die Impfstelle beschränktes Oedem.

26. Juni. Kaninchen IV und VI ebenfalls verendet während der Nacht. Bei der Sektion ist kein Oedem an der Impfstelle zu sehen; Milz wenig vergrößert; bei beiden ist blutig seröse Flüssigkeit in der Bauchhöhle.

Der negative Ausfall dieses Versuches kam trotz der günstigen Erfolge bei Versuch I, II und III nicht ganz unerwartet. Die Erklärung hierfür liegt ja sehr nahe

Kaninchen I hatte 18 ccm Anthrakaseimmunproteïdin subkutan und 4 ccm Anthrakaseimmunproteïdin intravenös;

Kaninchen II hatte 21 ccm Anthrakaseimmunproteïdin subkutan und 2 ccm Anthrakaseimmunproteïdin intravenös;

Kaninchen III hatte 40 ccm Anthrakaseimmunproteïdin subkutan erhalten.

Kaninchen IV war zwar ebenfalls mit 40 ccm Anthrakaseimmunproteïdin subkutan behandelt worden, doch lag zwischen letzter Immunisierung und Infektion ein Zeitraum von 4 Wochen. Während dieser Zeit hatte das Tier auch noch 3 Junge geworfen und gesäugt.

Kaninchen V hatte nur 7 ccm Anthrakaseimmunproteïdin und Kaninchen VI 11 ccm Anthrakaseimmunproteïdin subkutan erhalten.

Aus dieser Zusammenstellung läßt sich also schon mit Wahrscheinlichkeit schließen, daß einerseits die Quantität des eingeführten Immunproteïdin, andererseits der Zeitpunkt der Immunisierung einen ganz gesetzmäßigen Einfluß auf das Ergebnis des Versuches haben. Diese Gesetzmäßigkeit in der Wirkung wurde unterdessen auch von anderer Seite an größeren Versuchsreihen bestätigt. Nebenbei bemerkt, überstand ein von Prof. Emmerich bei Versuch IV mitverwendetes Kaninchen, das zuvor mit Pyocyanase und Anthrakase behandelt worden war, die Infektion vollständig.

Von Interesse war bei diesem Versuche auch noch der mikroskopische Befund, welchen Blut und Milz von Kaninchen V bei der Färbung nach Nakanishi ergab. Bei dieser Methode findet weder eine thermische noch stärkere chemische Veränderung der Bacillen statt, vielmehr tritt uns der Bakterienkörper hierbei in seiner natürlichen Gestaltung entgegen. Herr Prof. Emmerich konstatierte dabei folgenden Befund: „Man sieht gequollene Stäbchen, die mehr als das doppelte Volumen des normalen haben; Stäbchen, welche an einem Ende gequollen erscheinen, am anderen nicht, so daß sie ein keulenförmiges Aussehen haben und wie angenagt aussehen. Die gequollenen Stäbchen zeichnen sich meist durch starken Lichtglanz aus; oft zeigen sie auch gekrümmte Formen, unregelmäßig oder wurstförmig. Die keulenförmigen Stäbchen zeigen Färbungen, ähnlich wie die Diphtheriebacillen; die beiden Enden sind meist mehr gefärbt. Außerdem sieht man kurze, unregelmäßige und sehr schwach gefärbte Stäbchenfragmente in Form kurzer Stäbchen, Ovalformen u. s. w. Solche in Fragmente zerfallene Stäbchen sehen wie zerbröckelt aus.“

Ausstrichpräparate von der Milz des Kaninchens V einerseits und vom Kontrolltier andererseits zeigten bei der Färbung mittels der nach Czaplewski modifizierten Gram'schen Methode einen ganz augenfälligen Unterschied. Bei diesem Verfahren werden bekanntlich die lebenskräftigen Bacillen intensiv dunkelblau gefärbt, dagegen die toten oder im Absterben begriffenen hellrot. Bei Einstellung eines beliebigen Gesichtsfeldes ergab sich nun:

Milzbrandbacillen in einem Gesichtsfeld.

	Kaninchen V		Kontrollkaninchen	
	53 rot	5 blau	5 rot	50 blau
	40 „	2 „	10 „	69 „
	57 „	6 „	4 „	72 „
	49 „	3 „	3 „	80 „
Mittel	50 rot	4 blau	5,5 rot	68 blau

Es läßt uns dieser Befund direkt einen Einblick thun in den im Tierkörper stattfindenden Kampf zwischen Bakterien und den vernichtenden Kräften des Blutes, d. h. dem im Blute gelösten bakteriolytischen Immunproteïdin. Während bei dem Kontrolltier auf 68 intakte Milzbrandbacillen nur 5 durch das Alexin des normalen Blutes abgetötete treffen, ist das Verhältnis beim immunisierten Kaninchen gerade umgekehrt. Die bakterienvernichtende Wirkung des Blutes erscheint hier ganz bedeutend verstärkt durch das künstlich in den Körper eingeführte Immunproteïdin.

Ein neues Versuchstier, Kaninchen VII, graubraun (2010 g), erhält:

11. Juli 4,0 ccm Anthrakaseimmunproteïdin
14. „ 7,5 „ „
16. „ 7,5 „ „
18. „ 5,0 „ „

subkutan injiziert.

V. Versuch.

24. Juli abends. Kaninchen VII (2120 g) und Kontrollkaninchen (2400 g) werden mit je 1 ccm Bouillonaufschwemmung einer Milzbrandkultur geimpft, die ein Kaninchen in 48 Stunden getötet hatte. (Keimzahl 590 450.)

25. Juli. Beide Tiere fressen gut.

30. Juli. Beim Kontrolltier leichte Infiltration nachweisbar.

31. Juli. Kontrolltier ist während der Nacht verendet, also erst 7 Tage nach der Infektion. Sektion ergiebt mäßiges Oedem an der Impfstelle und geringe Mengen blutig-seröser Flüssigkeit in der Bauchhöhle; zahlreiche Bacillen im Blute. Das behandelte Kaninchen VII bleibt am Leben.

b) Immunisierung von Schafen.

Der nächste Versuch wird an Schafen angestellt.

Schaf I (2 Jahre alt, kräftig) wird am

27. Juni mit 15 ccm Anthrakaseimmunproteïdin
28. „ „ 70 „ „
30. „ „ 45 „ „
1. Juli „ 20 „ „

subkutan behandelt.

VI. Versuch.

Um den Versuch ganz objektiv auszuführen, wurde das immunisierte Schaf und ein gleichaltriges Kontrollschaf von gleichem Ernährungszustand Herrn Prof. Dr. Kitt an der tierärztlichen Hochschule überschickt, welcher beide Tiere am 2. Juli 11 Uhr vormittags mit je 1 ccm Bouillonaufschwemmung hochvirulenten Milzbrandes (3 Oesen Agarkultur auf 10 ccm Bouillon) durch subkutane Injektion infizierte. Ein Meerschweinchen erhielt 0,5 ccm derselben Mischung ebenfalls subkutan.

4. Juli. Kontrollschaf ist während der Nacht, etwa 40 Stunden nach der Infektion, verendet; das Meerschweinchen stirbt 10 Uhr vormittags, also 47 Stunden nach der Infektion.

Das schutzgeimpfte Schaf ist gesund und ohne Fieber.

Temperaturen (abends).

	1. Juli	2. Juli	3. Juli	4. Juli
Kontrollschaf	39,2	41,4	41,7	†
behandeltes Schaf I	39,6	39,5	39,7	39,3

Die an der tierärztlichen Hochschule vorgenommene Sektion des Kontrollschafes ergiebt typischen Milzbrandbefund; im Blute massenhaft Bacillen.

Schaf I, welches auf die schwere Infektion gar keine Krankheitserscheinungen zeigte, nimmt während der nächsten Wochen beträchtlich an Gewicht zu und bleibt auch späterhin ganz gesund.

Mit der gleichen Immunproteïdinlösung wird noch der folgende Versuch an zwei je $1^1/_2$ Jahre alten Schafen ausgeführt.

3. Sept. Schaf IV (schwarz) erhält 18 ccm Immunproteïdin, Schaf V (weiß) erhält 10 ccm Immunproteïdin.

VII. Versuch.

4. Sept. Schaf IV und V erhalten je 50 ccm Anthrakaseimmunproteïdin subkutan injiziert.

Um 2 Uhr nachmittags werden Schaf IV und V und ein Kontrollschaf mit je 1 ccm einer bei 24° C 24 Stunden lang gewachsenen Bouillonkultur subkutan am Hinterschenkel infiziert.

6. Sept. Kontrollschaf, schwer affiziert, frißt nicht mehr.

7. Sept. Kontrollschaf nachmittags dem Verenden nahe. Schaf V hat blutig gefärbten Ausfluß aus der Nase.

8. Sept. Kontrolltier ist nachts verendet. Bei Schaf V ist kein Blut mehr im reichlich abgesonderten Nasenschleim.

9. Sept. Die beiden schutzgeimpften Schafe sind anscheinend normal und fressen gut; bleiben auch weiterhin ohne krankhafte Erscheinungen.

Temperaturen (abends).

	5. Sept.	6. Sept.	7. Sept.	8. Sept.	9. Sept.
Kontrollschaf	41,8	41,9	—	†	—
Schaf IV	39,6	39,5	39,3	39,6	39,4
Schaf V	39,4	39,8	40,3	39,9	39,6

Nachdem eine neue Anthrakaseimmunproteïdinlösung gemäß dem oben angegebenen Verfahren hergestellt war, wurden folgende Versuche damit ausgeführt. Die Flüssigkeitskulturen waren statt bei 37° C bei 30° C geführt worden.

Schaf II und III erhalten am

3. Aug. je 24 ccm Anthrakaseimmunproteïdin
5. „ „ 50 „ „
7. „ „ 60 „ „
11. „ „ 50 „ „

subkutan.

Kaninchen VIII und IX erhalten am

3. Aug. je 3 ccm Anthrakaseimmunproteïdin
5. „ „ 7 „ „
7. „ „ 12 „ „
11. „ „ 10 „ „

subkutan.

VIII. Versuch.

11. Aug. 6 Uhr nachmittags. Schaf II, III und Kontrollschaf sowie Kaninchen VIII (2360 g), Kaninchen IX (2620 g) und Kontrollkaninchen (3200 g) werden mit je 1 ccm Bouillonaufschwemmung einer Agarmilzbrandkultur infiziert. Bei Kaninchen VIII blutet die Injektionsstelle ziemlich stark.

12. Aug. Die beiden Kontrolltiere fressen nicht mehr; die übrigen Tiere zeigen keine krankhaften Erscheinungen.

14. Aug. Das Kontrollkaninchen ist während der Nacht verendet, also 50—55 Stunden nach der Infektion. Sektion ergiebt starkes Oedem an der Bauchhaut; massenhaft Bacillen im Blute.

Vormittags 11 Uhr stirbt das Kontrollschaf. Leib stark aufgetrieben; aus Mund- und Nasenhöhle blutig-schleimiger Ausfluß; im Blute massenhaft Milzbrandbacillen.

15. Aug. Während der Nacht ist Kaninchen VIII verendet.

Zwischen 7 und 8 Uhr morgens verendet Schaf II.

Schaf III ist sehr unruhig; frißt nicht mehr; Kaninchen IX ohne krankhafte Erscheinungen.

16. Aug. Schaf III während der Nacht verendet. Blutproben von Schaf II und III lassen zahlreiche Milzbrandbacillen erkennen.

Kaninchen IX befindet sich wohl und frißt gut.

Temperaturen.

11. Aug. Infektion (abends)	Kontroll-schaf	Schaf II	Schaf III	Kontroll-kaninchen	Kaninchen VIII	Kaninchen IX
12. Aug. abends	40,0	—	39,1	38,6	38,4	—
13. „ morgens	41,0	38,9	38,6	40,6	38,6	38,3
13. „ abends	41,3	39,3	38,8	39,7	38,7	38,5
14. „ morgens	41,7	40,7	39,8	†	40,2	38,9
14. „ abends	†	41,5	40,2		39,3	38,9
15. „ morgens		†	40,9		†	38,5
15. „ abends			41,3			38,7
16. „ morgens			†			38,6

Der wider Erwarten ungünstige Ausgang dieses Versuches läßt sich, da doch verhältnismäßig große Mengen der Lösung injiziert waren (184 ccm für jedes Schaf, 32 ccm für jedes Kaninchen), nur auf einen sehr geringen Gehalt der Kulturflüssigkeit an Anthrakase zurückführen. Nur bei Kaninchen IX hatte die injizierte Menge von Immunproteïdin genügt, um das Tier gegen Krankheit und Tod zu schützen. Das genau ebenso vorbehandelte Kaninchen IX erlag der Infektion wahrscheinlich deshalb, weil die Kulturflüssigkeit in ein Blutgefäß injiziert wurde (starke Blutung bei der subkutanen Injektion).

Um bei weiteren Versuchen eine gewisse Sicherheit in der Dosierung des zu verwendenden Immunproteïdin zu gewinnen, wäre es demnach von größter Wichtigkeit, einen zuverlässigen Anhaltspunkt zu haben für den Gehalt der jeweils hergestellten Kulturflüssigkeit an bakteriolytischem Enzym. Einigermaßen kann derselbe bereits jetzt beurteilt werden aus der Beobachtung der baktericiden Wirkung der konzentrierten Enzymlösung in vitro. Diese Versuche müssen aber wahrscheinlich unter anaëroben Bedingungen ausgeführt werden, da nur dann und bei gleichzeitigem öfteren Schütteln eine baktericide Wirkung zu konstatieren sein dürfte. Durch die Fällung der Anthrakase oder des Immunproteïdin vermittelst Alkohol und Aether oder durch Ammoniumsulfat werden außer denselben auch noch andere in der Kultur befindliche Enzyme gefällt, so daß man hierdurch keinen Anhaltspunkt über die Quantität der in der Lösung befindlichen Anthrakase etc. erhält.

Eine andere Frage ist die, warum der Gehalt an Enzym der unter scheinbar gleichen Bedingungen gewonnenen Kulturflüssigkeit im einen Falle größer, im anderen geringer ist. Hierbei kommt zweifelsohne zunächst die Verschiedenheit der einzelnen Milzbrandbakterienrassen bezüglich ihrer Fähigkeit, bakteriolytisches Enzym zu bilden, in Betracht. Aber auch die verschiedene chemische Zusammensetzung der Nährlösung, die Intensität und Dauer der Entwickelung der Kultur, die Temperatur, bei welcher die letztere geführt wird, sowie vielleicht andere, noch nicht genau studierte Momente spielen hierbei eine Rolle. Sind einmal diese Einflüsse klar erkannt, so kann auch der Gehalt der Kulturflüssigkeit an bakteriolytischem Enzym im einzelnen Falle auf ein gewisses Maximum gesteigert und ein dementsprechend günstiges und konstantes Resaltat bei der Immunisierung erzielt werden, wie dies Prof. Emmerich bereits bei der Pyocyanase durch Feststellung der maßgebenden Bedingungen der Enzymanreicherung gelungen ist.

Fassen wir das Ergebnis aller vorhergehenden Versuche kurz zusammen, so läßt sich auf Grund derselben behaupten:

1) In keinem Falle war die immunisierende Wirkung bei Vorbehandlung mit Anthrakaseimmunproteïdin zu vermissen, wenn dieselbe auch bei ungünstigstem Ausgange nur eine Lebensverlängerung von etwa 15 Stunden gegenüber dem Kontrolltiere bedeutete.

2) Ausschlaggebend für den Erfolg ist die Quantität des eingeführten Anthrakaseimmunproteïdin; ist dieselbe genügend groß, so übersteht das Tier (Kaninchen oder Schaf) die gefährlichste Milzbrandinfektion ohne erhebliche Reaktion (Temperatursteigerung, Gewichtsverlust u. s. w.).

3) Von Belang ist auch die Zeitdifferenz zwischen Immunisierung und Infektion. Doch sind aus Obigem noch keine sicheren Schlüsse über die Immunitätsdauer zu ziehen.

4) Der Gehalt der einzelnen Kulturflüssigkeit an bakteriolytischem Enzym ist inkonstant infolge von Einflüssen, die zum Teil noch nicht bekannt sind. Es fehlt daher noch die Sicherheit in der Dosierung der zu injizierenden Flüssigkeit.

5) Durch die quantitative Bestimmung des Gehaltes an Immunproteïdin wird sich die zur Immunisierung notwendige Dosis desselben ermitteln lassen. Da aber solche Methoden noch nicht bekannt sind, so lassen sich einstweilen nur durch den anaëroben, baktericiden Versuch Anhaltspunkte für die Dosierung gewinnen.

Was nun die Immunisierungsversuche mit Immunserum und Kombination mit darauffolgender Injektion von Milzbrandbacillen anlangt, so dürfte es in dieser Beziehung genügen, die Schlußfolgerungen, welche sich aus der gründlichen Arbeit von Sobernheim ergaben, hier anzuführen[1]: „Alle diese Erfahrungen drängten notwendigerweise zu der Ueberzeugung, daß nicht die Mengen des verimpften Milzbrandserums, auch nicht einfache Unterschiede in der Art und Schnelligkeit der Antitoxinzufuhr oder Antitoxinausscheidung auf den Verlauf der Milzbrandinfektion bei Kaninchen von bestimmendem Einfluß sein konnten, sondern vielmehr andere Ursachen unbekannter Natur, welche, starken individuellen Schwankungen unterliegend, zu so überaus unsicheren Resultaten zu führen pflegen und daran ein exaktes, passives Immunisierungsverfahren scheitern lassen. Es stellt das Kaninchen offenbar eine Tierart dar, welche, bei voller Empfänglichkeit für die Infektion mit virulenten Milzbrandbakterien, der Immunisierung, der aktiven sowohl wie der passiven, erhebliche Hindernisse in den Weg legt. Während jedoch bei vorsichtiger Behandlung eine aktive Immunisierung dieser Tiere ohne Zweifel erreicht werden kann, leistet die passive Immunisierung, welche ihrer Natur nach eigentlich sichere und eindeutige Resultate geben sollte, so Unvollkommenes, daß man wohl den Gedanken aufgeben mußte, auf diesem Wege zu einer befriedigenden Lösung zu gelangen.“ Sehr günstig sind dagegen Sobernheim's Resultate bei der Immunisierung von Schafen. „Während zwei mit normalem Hammelserum vorbehandelte Kontrolltiere der Infektion innerhalb kürzester Frist und unter typischen Erscheinungen schutzlos zum Opfer fielen, vermochten die übrigen 5 Schafe, welche Milzbrandserum in verschiedener Menge, teils durch einmalige, teils durch wiederholte Injektionen, erhalten hatten, die Probeimpfung mit dem gleichen vollvirulenten Materiale unter geringfügigen Lokal- und Allgemeinreaktionen sicher zu überstehen. Auch gegen eine zweite Dosis virulenter

1) Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskr. Bd. XXXI. p. 103.

Milzbrandkultur erwiesen sich dieselben nach 2—2 1/2 Monaten völlig immun."

Es ist selbstverständlich, daß auch die Anthrakaseimmunproteïdinschutzimpfung mit der aktiven Immunisierung durch Milzbrandbacillen kombiniert werden kann, wenn sich dies überhaupt als notwendig erweisen sollte.

Ein Beitrag zur Anaërobenzüchtung.

[Aus dem kgl. Institute für Infektionskrankheiten Berlin.]

Von Dr. **D. Rivas** aus Nicaragua C.A.

Mit 4 Figuren.

Fast alle Versuche, die bis jetzt gemacht worden sind, um anaërobe Mikroorganismen zu züchten, basieren auf folgenden Methoden: 1) den Zutritt von Luft zum Nährboden zu verhindern; 2) die Luft aus dem Raume, in dem sich die Kultur befindet, auszupumpen; 3) dieselbe durch einen indifferenten Gasstrom zu verdrängen; 4) den Sauerstoff durch eine chemische Substanz (Pyrogallussäure), die in demselben Raume mit der anzulegenden Kultur sich befindet, zu absorbieren.

Bei allen diesen Methoden gebraucht man zahlreiche komplizierte Apparate, die trotz einer streng durchgeführten Technik nicht immer ein positives Resultat gewährleisten. Nur wer sich länger mit dem Züchten von Anaëroben beschäftigt hat, kennt die Schwierigkeiten, die einem durch die komplizierten Methoden erwachsen, und jedenfalls bedarf es vieler Uebung, bis man diese Methoden vollständig beherrscht.

Die idealste Methode wäre, durch einen geeigneten chemischen Zusatz den Nährboden frei von Sauerstoff zu machen und in diesem Zustande zu erhalten. Diesen Weg haben Kitasato und Weyl bereits beschritten, indem sie eine große Anzahl reduzierender und oxydierender chemischer Verbindungen anwandten, um die Anaëroben unter gewöhnlichen Bedingungen, d. h. in offenen Gefäßen wachsen zu lassen. Diese Autoren sind mit den Tetanus-, Rauschbrand- und malignen Oedembacillen zu folgendem Resultate gekommen:

Alle 3 Bacillenarten waren sehr gut in 0,1-proz. Brenzkatechin, 0,1-proz. Resorcin, 0,1-proz. Hydrochinon, 0,1-proz. Pyrogallol und 0,1-proz. ameisensaurem Natrium gewachsen. Tetanus spärlich in 0,05-proz. Acetaldehyd und 0,1-proz. Benzaldehyd, während Rauschbrand und malignes Oedem bei Gegenwart letzterer Verbindungen nicht wuchsen. Undeutlich war ihr Wachstum in Chinon und negativ in Hydroxylaminchlorhydrat. Es ist dabei zu bemerken, daß Kitasato und Weyl ihre Versuche nur in Hochschichtagar angestellt hatten, in dem auch ohne Zusatz der genannten reduzierenden Substanzen, wenn der Nährboden frisch bereitet ist, die Anaëroben zu wachsen pflegen. Schon Sanfelice sagte: „Zur Kultivierung der Anaëroben ist es nicht so wichtig, die Nährböden in dicken Schichten anzuwenden und reduzierende Substanzen zuzusetzen, als sie vielmehr gleich nach der Zubereitung anzuwenden." Kitasato und Weyl haben noch weiter Erfahrungen mit Aëroben gemacht und gefunden, daß Cholera- und Typhusbacillen in 0,1-proz. Chinon, in 0,1-proz. Brenzkatechin und in 0,1-proz. indigoschwefelsaurem

Anaërobenversuche in Agarschicht 6—8 cm hoch.

	Prozent	Tetanusbacillus		Maligner Oedembacillus		Rauschbrandbacillus		Bacillus spinosus	
		nach 1 Tage	nach 2 Tagen	nach 1 Tage	nach 2 Tagen	nach 1 Tage	nach 2 Tagen	nach 1 Tage	nach 2 Tagen
Indigoschwefelsaures Natrium	0,1	+ gut	+ sehr gut	+ gut	+ üppig	+ gut	+ üppig	+ gut	+ gut
Ameisensaures Natrium	0,4	+ „	+ üppig	+ „	+ „	+ „	+ „	+ „	+ „

Aërobenversuche in Agarschicht 6—8 cm hoch.

	Prozent	Milzbrandbacillus		Cholerabacillus		Proteus vulgaris		Bacillus subtilis	
		nach 1 Tage	nach 2 Tagen	nach 1 Tage	nach 2 Tagen	nach 1 Tage	nach 2 Tagen	nach 1 Tage	nach 2 Tagen
Indigoschwefelsaures Natrium	0,1	+ spärlich	+ spärlich	+ spärlich	+ gut	+ spärlich	+ spärlich	+ spärlich	+ gut auf der Oberfläche
Ameisensaures Natrium	0,4	+ „	+ „	+ „	+ „	+ „	+ gut auf der Oberfläche	+ „	+ gut auf der Oberfläche

Nach 2 Wochen ist dieser Nährboden nicht mehr so günstig. Die Anaëroben sind bis zu 48 Stunden nur spärlich gewachsen.

Natrium wuchsen, und ebenso in den zwei letzteren Substanzen Milzbrandbacillen. Also sind in diesem Nährboden Anaëroben und Aëroben ebenfalls gewachsen.

Mit dem von Kitasato und Weyl empfohlenen ameisensauren und indigoschwefelsauren Natrium habe ich ebenfalls gearbeitet und dabei vorstehende Resultate erzielt.

Der gleiche Weg ist von Trenkmann eingeschlagen, der sich auf die reduzierende Eigenschaft von Schwefelnatrium (Na_2S) stützt. Ihm gelang es, anaërobe Mikroorganismen in offenen Gefäßen zu züchten. Bei der Nachprüfung seiner Methode erhielt ich unter Benutzung der bei 100° eine Stunde erhitzten 1- und 10-proz. Lösung des Na_2S folgendes Resultat (s. Tabelle p. 833).

Wie ersichtlich, sind die Tetanus-, malignen Oedem-, Rauschbrand- und Spinosus-Bacillen in diesem Nährboden gewachsen, aber die zwei nicht geimpften Bouillonröhrchen mit Na_2S-Lösung waren ebenfalls nach 24 Stunden regelmäßig leicht getrübt. Deshalb begann ich die Reinheit der erhaltenen Kulturen zu untersuchen: Ich nahm die Röhrchen No. 7 von Tetanus, malignem Oedem, Rauschbrand und Spinosus, in denen das Wachstum am günstigsten war, machte von diesen Präparate und fand unter dem Mikroskop keine Verunreinigungen. In jedem Röhrchen waren die typischen Stäbchen zu sehen, und zwar die Tetanusbacillen mit typischen Sporen. Von jedem Röhrchen habe ich ferner einige Tropfen in gewöhnliche Bouillon eingeimpft, die nach 24 und 48 Stunden ganz klar geblieben war. Weiter habe ich von der Tetanuskultur einige Tropfen in den rechten Fuß eines Meerschweinchens eingespritzt; schon nach 16 Stunden war das Bein gelähmt, nach 18 Stunden war es ganz steif und unbeweglich, die Sohle nach oben gekehrt, der Körper nach der linken Seite eingebogen; dazu waren leichte Konvulsionen eingetreten; nach 19 Stunden lag das Tier auf der linken Seite, ganz gelähmt, mit dem rechten Fuße nach oben, die Atmung erschwert, und es starb nach 20 Stunden. Bei der Autopsie wurden keine besonderen Veränderungen in den Organen oder im Blute gefunden. Also war der Tetanusbacillus doch in diesem Nährboden gewachsen.

Nun begann ich der Ursache näherzutreten, weshalb die Röhrchen mit der Na_2S-Lösung getrübt, trotzdem sie gar nicht geimpft waren.

Die zwei getrübten Röhrchen habe ich mikroskopisch mit negativem Resultate untersucht; sodann impfte ich von jedem einige Tropfen in gewöhnliche Bouillon über. Das Resultat war negativ. Die Röhrchen sind stets klar und steril geblieben. Wahrscheinlich ist durch die Berührung mit der Luft oder durch irgend einen noch nicht sichergestellten chemischen Vorgang Schwefel frei geworden, wodurch die Flüssigkeit getrübt wurde. Daß die in feinster Form ausgeschiedene Masse Schwefel war, läßt sich daraus entnehmen, daß die trübenden Teilchen sich in Chloroform und auch in Aether lösten; die vorher getrübte Bouillon wurde durch diese Zusätze wieder klar.

Um zu prüfen, wie lange diese Röhrchen brauchbar bleiben, bereitete ich den Nährboden von neuem. Nach 3 Tagen impfte ich einen Teil der Röhrchen mit Tetanus, malignem Oedem, Rauschbrand und Bacillus spinosus. Nach 48 Stunden war die Bouillon nicht verändert. Das Wachstum war so schwach, daß nur durch mikroskopische Untersuchung einige Stäbchen zu sehen waren. 0,5 ccm von der Te-

Anaërobenversuche in Na_2S-Bouillonröhrchen.

	No. Tropfen	Tetanusbacillus		Maligner Oedembacillus		Rauschbrandbacillus		Spinosusbacillus	
		nach 1 Tage	nach 2 Tagen	nach 1 Tage	nach 2 Tagen	nach 1 Tage	nach 2 Tagen	nach 1 Tage	nach 2 Tagen
1) Anaërobe Kontrolle		+ gut	+ gut	+ kräftig	+ kräftig	+ üppig	+ üppig	+ üppig	+ kräftig
2) Bouillon ohne Na_2S als aërobe Kontrolle		—	—	—	—	—	—	—	—
3) Bouillon 9 ccm + Na_2S 1-proz. Lösg.	1	—	—	—	—	—	—	—	—
4) „ 9 „ + „ 1- „ „	2	—	—	—	—	—	—	—	—
5) „ 9 „ + „ 1- „ „	4	—	—	+ ?	+ spärlich	—	+ ?	—	—
6) „ 9 „ + „ 1- „ „	6	+ ?	+ ?	+ spärlich	+ gut	+ ?	+ spärlich	+ ?	+ spärlich
7) „ 9 „ + „ 1- „ „	8	+ spärlich	+ spärlich	+ gut	+ „	+	+ gut	+ spärlich	+ „
8) „ 9 „ + „ 10- „ „	1	—	—	+ „	+ „	+ spärlich	+ „	—	—
9) „ 9 „ + „ 10- „ „	2	—	—	+ „	+ „	+ gut	+ „	—	—
10) „ 9 „ + „ 10- „ „	4	—	—	+ „	+ „	+ „	+ „	—	—
11) „ 9 „ + „ 10- „ „	6	—	—	+ „	+ „	+ „	+ „	—	—
12) „ 9 „ + „ 10- „ „	8	—	—	+ spärlich	+ „	+ „	+ „	—	—
13) „ 9 „ + „ 10- „ „	10	—	—	+ „	+ spärlich	+ spärlich	+ spärlich	—	—

Anmerkung. Daneben werden 2 Röhren mit gewöhnlicher Bouillon, eine mit 10 Tropfen von der 1-proz. Na_2S-Lösung und die andere mit 4 Tropfen von 10-proz. Na_2S-Lösung, eingeimpft im Brütschranke gehalten, um zu sehen, ob die Lösung keimfrei ist.

tanuskultur, einem Meerschweinchen eingespritzt, erzeugte erst nach 24 Stunden die Tetanussymptome, nach 48 Stunden starb das Tier.

Nach 6 Tagen habe ich eine andere Anzahl der Röhrchen mit Tetanusbacillus geimpft. Im Laufe von 2—4 Tagen sowie einer Woche blieb die Bouillon unverändert und die mikroskopische Untersuchung der Bouillon ergab Sterilität. Obschon diese Methode also wissenschaftlich von Wichtigkeit sein kann, ist sie doch wegen der leicht eintretenden Trübung des Nährbodens und weil er verhältnismäßig schnell unbrauchbar wird, praktisch kaum verwendbar.

Ich prüfte gleichfalls die Methode von Hammerl, der die reduzierende Eigenschaft von Ammoniumsulphohydrat NH_4SH benutzend, einen Nährboden mit dieser Substanz bereitet; es gelang ihm auf diese Weise, die Züchtung von Anaëroben auf Platten unter gleichzeitiger Anwendung von Gas. Auf seinen Platten wuchs der Milzbrandbacilus nicht.

Zu diesem NH_4SH-Nährboden habe ich zuerst die Anaëroben Tetanus, malignes Oedem, Rauschbrand und Spinosus in einer Agarschicht von 6—8 cm Höhe mit günstigem Resultate gezüchtet und danach die Aëroben Cholera, Milzbrand, Proteus vulgaris und subtilis untersucht; diese letzteren wuchsen spärlich oder auch gar nicht.

Nachdem ich mich so in Uebereinstimmung mit Hammerl von der stark reduzierenden Eigenschaft des mit Ammonsulfithydrat versetzten Nährbodens überzeugt hatte, dachte ich daran, damit einen flüssigen Nährboden zu versuchen. Zu dem Zwecke habe ich Bouillon in demselben Verhältnisse wie Agar zubereitet, in Reagensröhrchen verteilt und mit einer Oelschicht von ungefähr 2 ccm Höhe bedeckt und die so vorbereiteten Röhrchen ungeimpft im Brütschranke bei + 37° belassen, um zu prüfen, ob sie keimfrei seien und dann im Laufe des 2. Tages einen Teil der Röhrchen mit den 4 von mir immer benutzten Anaëroben beschickt, und zwar mit sehr gutem Resultate, denn alle Kulturen waren sehr gut gewachsen; um zu sehen, wie lange die Röhrchen sich hielten, impfte ich nach 4 Tagen wieder einen anderen Teil der Röhrchen; nach 24 Stunden war die Bouillon ganz getrübt und nach 48 Stunden das Wachstum kräftig. Aber als ich nach 6 Tagen wieder einen anderen Teil der Röhrchen impfte, ergab sich ein ganz anderes Bild. Nach 24 Stunden war die Bouillon noch klar, nach 48 Stunden war sie leicht getrübt, das Wachstum war also sehr schwach. Die nach 8 Tagen geimpften letzten Röhrchen blieben bis zu 1 Woche und länger ganz klar. Es war leicht zu begreifen, daß die Oelschicht nicht genügend war, um den Zutritt von Luft zu verhindern. Um es zu beweisen, habe ich andere Röhrchen mit NH_4SH-Bouillon wie früher zubereitet und mit 2 ccm Oelschicht bedeckt, ich brachte 3 Tropfen einer konzentrierten wässerigen Methylenblaulösung in diese Bouillon, nach 6 Minuten war sie ganz entfärbt, schon am nächsten Tage aber war ein undeutlicher blauer Ring oben an der Grenze von Bouillon und Oelschicht, nach 2 Tagen war fast die Hälfte von dem Röhrchen schwach blau gefärbt. Am 3. Tage war das ganze Bouillonröhrchen blau.

Nach dieser Beobachtung versuchte ich ein Mittel zu finden, um den Eintritt von Luft in den Nährboden auf das geringste Maß herabzusetzen. Zu diesem Zwecke habe ich eine Anzahl von Reagensröhrchen mit einer Einschnürung versehen in der Art, wie Fig. 1 und 2 es zeigen, nachdem frische Nährböden bereitet waren, wurden die Röhrchen bis zum Anfange der Einschnürung *a* mit Bouillon angefüllt und dieselbe

wie gewöhnlich mit Oel bis *c* bedeckt. Nach Einführung von 3 Tropfen konzentrierter Methylenblaulösung entfärbte sich die Bouillon in 5 Minuten gänzlich; und diese Röhrchen blieben auch nach 1 Monate stets ganz entfärbt. Nach dieser Vorprobe impfte ich meinen Nährboden mit den 4 Anaëroben und fand, daß sie in allen Röhrchen sehr gut wuchsen. Aëroben, wie Cholera-, Milzbrand-, Proteus vulgaris- und Subtilis-Bacillen, wuchsen in einigen Fällen, in anderen nicht; ihr Wachstum war jedoch, wenn positiv, immer nur sehr schwach. Jedoch beobachtete ich bei Wiederholung der Versuche, daß die Anaëroben in Hochschichtenagar oder auch in Bouillon zwar manchmal kräftig, manchmal jedoch schwach oder gar nicht wuchsen, und ebenso verhielten sich die Aëroben. Mit anderen Worten, die Resultate waren ungleich, trotzdem die Zubereitung des Nährbodens immer dieselbe war. Da aber die Menge des Schwefelwasserstoffes, die während der Durchleitung durch das Wasser absorbiert wird, nicht immer dieselbe ist, dachte ich, daß vielleicht in einigen Fällen zu viel davon absorbiert wäre und antiseptisch wirken könnte; andererseits gab es auch kein Mittel, die Absorption von Sauerstoff aus der Luft während der Zubereitung des Nährbodens zu kontrollieren, ich suchte daher nach einem solchen Mittel und habe zu gleicher Zeit die Menge von Ammonsulfithydrat in dem Nährboden vermindert, da das Verhältnis von 1 zu 10 mir nicht nur unnötig, sondern sogar schädlich für das Wachstum zu sein schien. Daher wurde der Nährboden folgendermaßen zusammengesetzt:

Fig. 1.

Fig. 2.

1) Bouillon, sehr schwach alkalisch, mit 1 Proz. Traubenzucker und 1,5 Proz. Pepton;
2) 10-proz. indigoschwefelsaure Natriumlösung in destilliertem Wasser, 1 Stunde auf 100° erhitzt;
3) 1-proz. Ammoniaklösung in destilliertem und sterilisiertem Wasser;
4) Schwefelwasserstoffwasser, folgendermaßen vorbereitet:

150—200 ccm destilliertes Wasser wird in einen Erlenmeyer-Kolben gefüllt, der Kolben mit Watte verstopft. Durch diesen Pfropfen führt ein gebogenes Glasröhrchen bis zum Grunde des Kolbens. Die äußere Mündung dieses Glasröhrchens wird mit Watte verstopft; das Ganze im Autoklaven bei 120° 15 Minuten lang sterilisiert. Nach der Abkühlung wird durch dieses Wasser ein Strom von Schwefelwasserstoff (aus dem Kippschen Apparate) gerade 5 Minuten lang hindurchgeleitet, nachdem dieser Gasstrom vorher durch ein vorgelegtes Kölbchen gewaschen worden ist. Dann werden 10 Reagensröhrchen jedes mit 10 ccm des erhaltenen Schwefelwasserstoffwassers gefüllt und jedes Röhrchen, wie folgt, behandelt: Von der 1-proz. Ammoniaklösung wird dem ersten Röhrchen 1 Tropfen, dem zweiten 2 Tropfen, dem dritten 3 Tropfen u. s. w. hinzugefügt, alle werden stark geschüttelt und jedes mit noch 3 Tropfen von einer 10-proz. Methylenblaulösung in 50-proz. Alkohol

versetzt. Nun beobachtet man, welches von den Röhrchen in ungefähr 1 Minute entfärbt ist und eine klare, völlig durchsichtige Flüssigkeit zeigt. Im allgemeinen genügen hierzu ungefähr 3—6 Tropfen der 1-proz. Ammoniaklösung. Nachdem die richtige Menge von Ammoniak gefunden ist, giebt man 20 ccm des Schwefelwasserstoffwassers in einen sterilisierten Cylinder, fügt das Ammoniak hinzu und schüttelt stark, ungefähr 10 oder 12 Tropfen sind für die 20 ccm genügend.

Dieses Ammoniumsulfithydratwasser wird in dem Verhältnis von 5 zu 100 dem Nährboden hinzugefügt. Der Nährboden besteht also jetzt aus:

1)	Nährboden, Bouillonagar oder Gelatine	479 ccm
2)	Ammonsulfithydratwasser	20 „
3)	indigoschwefelsaure 10-proz. Natriumlösung	1 „
		Sa.: 500 ccm

Sobald dem Nährbooen das indigoschwefelsaure Natrium zugefügt ist, wird die Bouillon blau, ist aber der Nährboden richtig gemacht, so muß er in ungefähr 1 Minute, nach Zusatz des NH_4SH-Wassers, ganz klar und durchsichtig werden.

Zur Zubereitung des Schwefelwasserstoffwassers benutzt man eine kalte 30-proz. Schwefelsäurelösung und man muß während aller Vorbereitungen des Nährbodens dieses Schwefelwasserstoffwasser sorgfältig von der Flamme entfernt und kalt halten, sonst wird es trübe und unbrauchbar. Hat man sich eine Bouillon hergestellt, so werden die mit Einschürung versehenen Röhrchen bis *a* mit Bouillon gefüllt und dann bis *c* mit sterilisiertem Olivenöl bedeckt und mit Watte und einer Gummikappe geschlossen (alles dies möglichst schnell). Diese Röhrchen kommen auf 48 Stunden in den Brütschrank von 37°. Nach Verlauf von 2 Tagen werden die Röhrchen, die blau oder trübe sind, als unbrauchbar ausgeschieden und nur diejenigen, die klar und farblos geblieben oder höchstens ganz leicht blau gefärbt sind, sollen benutzt werden.

Agar oder Gelatine werden, ebenfalls in gewöhnlichen Reagensröhrchen verteilt, 2 Tage im Brütschranke gelassen und derselben Prüfung wie die Bouillonröhrchen unterworfen.

Gewöhnlich habe ich die Agar- und Gelatineröhrchen mit einigen Tropfen Olivenöl bedeckt, um den Zutritt von Luft, der bei der Impfung durch den Draht stattfindet, zu verhindern. — Ich bin der Ansicht, daß die negativen Resultate, die ich ohne diese Vorsichtsmaßregel öfter bei Stichkulturen hatte, auf dem Zutritt von Luft bei der Impfung beruhten.

Es ist zu bemerken, daß an der Oberfläche des Agars oder der Gelatine im Laufe der Zeit eine weiße ringförmige Trübung zu sehen ist, die man auf den ersten Blick für eine Verunreinigung halten könnte, das ist jedoch nicht der Fall; ich habe die Trübungen sehr oft mikroskopisch untersucht, auch Kulturen davon angelegt und habe keine Verunreinigung mit Bakterien gefunden. Die Ursache ist hier wahrscheinlich dieselbe wie beim Schwefelnatrium, eine Schwefelausscheidung.

Die Bouillonröhrchen bleiben 3 Wochen und länger brauchbar, die von Agar und Gelatine gefertigten 1 Monat und länger.

Diese Methode besitzt aber eine Unannehmlichkeit: den bei der Zubereitung der Nährböden entstehenden Geruch von H_2S-Gas; man kann, um dies zu vermeiden, den Nährboden auch auf folgende Weise darstellen:

Für 500 ccm Nährboden:

1) Bouillon mit 1 Proz. Traubenzucker und 1,5 Proz. Pepton, 474 ccm.

2) Indigoschwefelsäurenatrium, 10-proz. Lösung in destilliertem Wasser, 1 Stunde lang bei 100° erhitzt, 1 ccm.

3) Schwefelnatrium (Na_2S), 1-proz. Lösung in destilliertem Wasser, 1 Stunde auf 100° erhitzt, 25 ccm.

Die Bouillon wird in Röhrchen mit Einschnürung gefüllt und alle mit Oel bedeckt, wie oben beschrieben, mit Gummikappen geschlossen und 48 Stunden im Brütschrank gelassen. Dieser Nährboden scheint aber nicht so günstig zu sein, da das Wachstum nicht so gut und kräftig ist wie auf dem NH_4SH-Nährboden. Die Impfung der Röhrchen ist wegen des Oeles mit ausgezogenen Pipetten vorzunehmen.

Mit den NH_4SH-Nährböden habe ich folgende Resultate gewonnen:

NH_4SH-Bouillonröhrchen mit Einschnürung und mit Oel bedeckt bei 37° C.

	Tetanus		Malignes Oedem		Rauschbrand		Spinosus	
	Nach 1 Tage	Nach 2 Tagen	Nach 1 Tage	Nach 2 Tagen	Nach 1 Tage	Nach 2 Tagen	Nach 1 Tage	Nach 2 Tagen
	+ gut	+ sehr gut	+ gut	+ kräftig	+ gut	+ üppig	+ gut	+ üppig
Aërobe Kontrolle in gewöhnlicher Bouillon	—	—	—	—	—	—	—	—

NH_4SH-Agarschicht 6—8 cm hoch mit Oel bedeckt bei 37° C.

	Tetanus			Malignes Oedem			Rauschbrand			Spinosus		
	Nach 2 Tagen	Nach 3 Tagen	Nach 4 Tagen	Nach 2 Tagen	Nach 3 Tagen	Nach 4 Tagen	Nach 2 Tagen	Nach 3 Tagen	Nach 4 Tagen	Nach 2 Tagen	Nach 3 Tagen	Nach 4 Tagen
	+	+ gut	+ üppig	+ gut	+ kräftig	+ kräftig	+ gut	+ kräftig	+ kräftig	+ ?	+ spärl.	+ gut
Aërobe Kontrolle in gewöhnlicher Bouillon	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

NH_4SH-Gelatineschicht 6—8 cm hoch mit Oel bedeckt bei 22° C.

	Tetanus			Malignes Oedem			Rauschbrand			Spinosus		
	Nach 3 Tagen	Nach 6 Tagen	Nach 8 Tagen	Nach 1 Tage	Nach 2 Tagen	Nach 3 Tagen	Nach 1 Tage	Nach 2 Tagen	Nach 3 Tagen	Nach 1 Tage	Nach 2 Tagen	Nach 3 Tagen
	+	+ gut	+ verflüss.	+ ?	+ üppig	+ verflüss.	+ ?	+ üppig	+ verflüss.	+	+ gut	+ verflüss.
Aërobe Kontrolle in gewöhnlicher Bouillon	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Um zu konstatieren, ob die Kulturen rein waren, wurden sie auf gewöhnliche Bouillon übergeimpft. Alle blieben steril und bewiesen dadurch, daß nur strenge Anaëroben gezüchtet worden waren. Von der Tetanuskultur wurden auch einige Tropfen Meerschweinchen subkutan eingespritzt, worauf diese schnell an Tetanus eingingen.

Aëroben-Versuche.

NH_4SH-Bouillonröhrchen mit Einschnürung und mit Oel bedeckt.

Milzbrand			Cholera			Proteus vulgaris			Subtilis		
Nach 1 Tage	Nach 2 Tagen	Nach 3 Tagen	Nach 1 Tage	Nach 2 Tagen	Nach 3 Tagen	Nach 1 Tage	Nach 2 Tagen	Nach 3 Tagen	Nach 1 Tage	Nach 2 Tagen	Nach 3 Tagen
+ ?	+	+ spärlich	+	+ spärlich	+ spärlich	+	+ spärlich	+ spärlich	—	—	—

NH_4SH-Agarschicht 6—8 cm hoch mit Oel bedeckt.

Milzbrand			Cholera			Proteus vulgaris			Subtilis		
Nach 2 Tagen	Nach 3 Tagen	Nach 4 Tagen	Nach 2 Tagen	Nach 3 Tagen	Nach 4 Tagen	Nach 2 Tagen	Nach 3 Tagen	Nach 4 Tagen	Nach 2 Tagen	Nach 3 Tagen	Nach 4 Tagen
+ ?	+ spärlich	+ spärlich	+ spärlich	+ spärlich	+ spärlich	+ spärlich	+ spärlich	+ spärlich	+ ?	+ spärlich	+ spärlich gut auf der Oberfl.

NH_4SH-Gelatineschicht 6—8 cm hoch mit Oel bedeckt.

Milzbrand			Cholera			Proteus vulgaris			Subtilis		
Nach 2 Tagen	Nach 3 Tagen	Nach 4 Tagen	Nach 2 Tagen	Nach 3 Tagen	Nach 4 Tagen	Nach 2 Tagen	Nach 3 Tagen	Nach 4 Tagen	Nach 2 Tagen	Nach 3 Tagen	Nach 4 Tagen
+ ?	+ ?	+ ? nicht verflüss.	+ ?	+ ?	+ ? nicht verflüss.	+ ?	+	+	+ ?	+ spärlich	+ oben verflüss.

Diese Versuche wurden öfter und stets mit demselben Resultate wiederholt. Die Cholera- und Milzbrandbacillen wuchsen allerdings schwach in diesem Nährboden, obgleich er frisch und ganz entfärbt war. Nach meiner Erfahrung möchte ich behaupten, daß die Cholera- und Milzbrandbacillen nicht fakultative Anaëroben sind — dazu müßte man zuerst konstatieren, daß mein Nährboden absolut frei von Sauerstoff ist — sondern daß beide Bacillen, obschon nur schwach, unter denselben Bedingungen wie die Tetanus-, malignen Oedem-, Rauschbrand- und Spinosus-Bacillen wachsen können.

Um auch isolierte Kolonieen zu studieren, habe ich für das Wachstum in Platten ein Kulturgefäß benutzt, das ermöglicht, die Kolonieen der Anaëroben unter dem Mikroskop während des Wachstums zu beobachten.

Mein Apparat ist eine flache, breite Glasröhre (Fig. 3), mit einem lang ausgezogenen Ende (Fig. 4) und von ungefähr 8 ccm Inhalt; an dem Ende *a* mit Watte verstopft und an der Stelle *f* ausgezogen, alles sterilisiert.

Beim Gebrauch dieser Platten wird zuerst der Agar oder die Gelatine im Reagenzröhrchen verflüssigt, die Röhrchen geimpft und die Verdünnung gemacht. Dann bricht man das ausgezogene Ende *g* bei *h* ab, zieht dasselbe einige Male schnell durch die Flamme und führt die



Fig. 3.

Spitze gleich bis zum Grunde des Röhrchens; durch Saugen an der Stelle *a* füllt man die Platten bis an den schmalen Hals *b* mit dem geimpften Material und schließt die Platte an den Enden *b* und *f* durch Zuschmelzen. Die so angefertigten Platten kommen in den Brütschrank und man kann nun jeden Tag die Entwickelung der Kolonieen studieren. Da der Apparat oder vielmehr die Platte flach ist, kann man die Kolonieen mit der größten Bequemlichkeit unter dem Mikroskop sehen, auch kann man sie so leicht photographieren.

Will man nun die Kolonieen weiter verarbeiten, z. B. abstechen und überimpfen u. s. w., so ist zuerst die Platte mit Sublimat und Alkohol zu waschen, dann mit einem Diamanten oder mit einer scharfen Feile an den Stellen *c*, *d* und *e* zu ritzen und mit Hilfe eines Stückchen Glases bei *c* und *e* abzubrechen. Die Platte ist nun geöffnet, hiernach wiederholt man dasselbe bei *d*. Nachdem die Platte durchgebrochen ist, wird die Kultur gleich in eine sterilisierte Petri-Schale ausgegossen und von dort aus kann sie nun auf einen anderen Nährboden übertragen und fortgezüchtet werden.

Mit dieser Methode habe ich Tetanus, malignes Oedem, Rauschbrand und Spinosus in NH_4SH-Nährboden studiert. Um aber auch den Wert der Methode für die Praxis kennen zu lernen, habe ich direkt mit Erde und Pferdekot gearbeitet.

Fig. 4.

Aus dem ödematischen Exsudat eines mit Gartenerde geimpften Meerschweinchens habe ich einen Anaërobenbacillus isoliert, dessen Beschreibung folgt:

Kurze dicke, lebhaft bewegliche Stäbchen von 2—4 mm Länge und ungefähr 0,5 mm Breite, mit ovalen Sporen, wodurch der Bacillus in der Mitte verdickt erscheint. Diese Stäbchen treten einzeln oder in Paaren auf; sehr selten wird eine Kette aus drei oder vieren gebildet. Färbbar nach Gram.

Kultur: Wächst nur unter anaëroben Bedingungen. Bouillon stark getrübt in 24 Stunden.

Agar: Die Stichkultur giebt nach 48 Stunden bei 37° einen dicken, weißen Strich. In Gelatine leicht flockiges Wachstum, nach 10 Tagen ist die Gelatine leicht verflüssigt. — Kolonie: In Agar sind nach ein oder zwei Tagen kleine Kolonieen mit einem dunklen Kerne und unregelmäßigem Rande zu sehen, später vergrößert sich die Kolonie. Der Kern wird etwas heller, der Rand erhält unregelmäßige Flöckchen. — Tierversuche: Bei Meerschweinchen tritt bald nach dem Impfen Schwellung an der Impfstelle auf. Das Tier scheint zu leiden, denn es klagt und sitzt zusammengedrückt in einer Ecke des Käfigs. Nach einiger Zeit wird es ruhiger und nach Ablauf von 24 Stunden war es tot. Manchmal war die Kultur so virulent, daß der Tod schon nach Verlauf von 12 Stunden eintrat. Bei der Autopsie fand sich subkutanes

Oedem in der Nachbarschaft der geimpften Stelle. Die inneren Organe erscheinen nicht verändert. Bacillen fehlten in den Präparaten, den Organen und dem Blute; nur wenige Bacillen wurden an der geimpften Stelle und im subkutanen Oedemexsudat gefunden. Von diesem Exsudat wurde ein neues Meerschwein geimpft, welches bald unter denselben Symptomen starb. Ein von diesem geimpftes drittes wurde nur noch leicht krank, ein viertes überhaupt nicht mehr. Ebenfalls vom Exsudat des ersten Meerschweinchens wurde eine Kultur angelegt und nach 24 Stunden davon ein Meerschweinchen wieder geimpft; dieser Vorgang wurde sehr oft wiederholt und nach einigen Passagen (3—4) war die Virulenz der Kultur abgeschwächt. 1 ccm der 24 Stunden alten Kultur eingespritzt, gab nur leichte Schwellungen an der geimpften Stelle, später wurde sie dann ganz unschädlich.

Aus dem Eiter eines mit Pferdekot geimpften Meerschweinchens habe ich einen zweiten Bacillus isoliert:

Dünne Stäbchen, 2—5 mm lang und ungefähr 0,3 mm breit, sehr lebhaft beweglich, mit ovalen Sporen am Ende. Die Stäbchen sind einzeln oder in einer Kette von 2—5 verbunden; leicht färbbar, auch nach Gram.

Kultur wächst nur unter anaëroben Verhältnissen. Bouillon wird in 24 Stunden stark getrübt. Nach 48 Stunden dicker Niederschlag am Grunde des Röhrchens. — Kolonie in Gelatine nach 24 Stunden: helle, kleine Kolonie mit einem sehr kleinen Kern in der Mitte, von welchem feine Strahlen ausgehen. Nach 2 Tagen vergrößert sich die Kolonie und zeigt kleine, etwas dunkle Flecken, begrenzt von einer klaren Zone. Später, am dritten Tage, gehen Strahlen aus der Peripherie dieser Zone und am vierten Tage ist die Gelatine stark verflüssigt. — In Agar giebt es ein sehr charakteristisches Bild: In der Stichkultur sieht man horizontale Aeste, welche nie die Richtung nach unten nehmen. Nach einer Woche giebt es das Bild eines umgekehrten Tannenbaumes. — Tierversuche: Im wesentlichen negativ, nur bei weißen Mäusen wurde einige Male nach subkutaner und intraperitonealer Impfung mit 0,1 ccm ein positives Resultat erhalten. Die Milz war dabei vergrößert und im Blute wie in den Organen waren die Bacillen in geringen Mengen nachzuweisen.

Ich denke also eine neue Methode gefunden zu haben, welche die Züchtung der Anaëroben mit absolut einfachen Hilfsmitteln und Apparaten, ohne Zuhilfenahme eines großen Instrumentariums, ermöglicht.

Ich gestatte mir, Herrn Geh. Med.-Rat. Prof. Dr. R. Koch für seine Liebenswürdigkeit, mit welcher er mir erlaubt hat, im Institut zu arbeiten, meinen Dank auszusprechen. Ebenfalls Herrn Prof. Dr. P. Frosch, Vorsteher der wissenschaftlichen Abteilung, für seine Ratschläge während meiner Arbeit, sowie für die mir jederzeit persönlich erwiesene Freundlichkeit. Ferner den Herren Prof. Zettnow, Wernicke und Calmette für die Bereitwilligkeit, mit der diese Herren mir das Bakterienmaterial zur Verfügung gestellt haben.

Litteratur.

Botkin, Eine einfache Methode zur Isolierung anaërober Bakterien. (Zeitschr. f. Hyg. Bd. IX. p. 383.)
Carle e Rattone, Studio esperimentale sull'eziologia del tetano. (Giornale della R. Accad. di Med. di Torino 1884. No. 3.)
Duclaux, Vie aërobie et anaërobie. (Traité de Microbiologie. Vol. II. Chap. XI. p. 203.)
Fränkel, C., Ueber die Kultur anaërober Mikroorganismen. (Centralbl. f. Bakt. Bd. III. p. 735.)
Gruber, Eine Methode der Kultur anaërobischer Bakterien. (Centralbl. f. Bakt. Bd. I. p. 367.)
Hammerl, Ein Beitrag zur Züchtung der Anaëroben. (Centralbl. f. Bakt. I. Abt. Bd. XXX. p. 658.)
Hesse, W. u. R., Ueber Züchtung der Bacillen des malignen Oedems. (Deutsche med. Wochenschr. Bd. XI. 1855. p. 214.)
Kitasato, Ueber den Rauschbrandbacillus und sein Kulturverfahren. (Zeitschr. f. Hyg. Bd. VI. p. 105). — Ueber den Tetanusbacillus. Bd. VII. p. 225. — Ueber das Wachstum des Rauschbrandes im festen Nährboden. Bd. VIII. p. 55.
Kitasato u. Weyl, Zur Kenntnis der Anaëroben. (Zeitschr. f. Hyg. Bd. VIII. p. 41 u. 404.)
Kit, Th., Der Rauschbrand. (Centralbl. f. Bakt. Bd. I. p. 684.)
Liborius, Beitrag zur Kenntnis des Sauerstoffbedürfnisses der Bakterien. (Zeitschr. f. Hyg. Bd. I. p. 115.)
Lüderitz, Zur Kenntnis der anaëroben Bakterien. (Zeitschr. f. Hyg. Bd. V. p. 141.)
Nicolaier, Zur Aetiologie des Krampftetanus (rote). (Virch. Arch. f. path. Anat. Bd. CIIXXX. p. 1.) — Ueber infektiösen Tetanus. (Med. Wochenschr. 1884. p. 842.)
Roux, Sur la culture des microbes anaërobies. (Ann. de l'Institut Pasteur. Vol. I. p. 49.)
Sanfelice, Untersuchungen über anaëroben Mikroorganismen. (Zeitschr. f. Hyg. Bd. XIV. p. 339.)
Trenkmann, Das Wachstum des anaëroben Bakteriums. (Centralbl. f. Bakt. Bd. XXIII. p. 1038 u. 1087.)
Ucke, A., Ein Beitrag zur Kenntnis der anaëroben Bakterien. (Centralbl. f. Bakt. Bd. XXIII. p. 996.)
Vignal, Sur un moyen d'isolation et de culture des microbes anaërobies. (Ann. de l'institut Pasteur. T. I. p. 158.)

Weitere Beiträge zur Malariaplasmodienfärbung mittels A-Methylenblau-Eosin.

Von Dr. **Karl Reuter**, Hamburg-Eppendorf.

Die im vergangenen Jahre in Bd. XXX. No. 6. 26. Aug. 1901 dieser Zeitschrift [1]) von mir veröffentlichten Untersuchungen „Ueber den färbenden Bestandteil der Romanowsky-Nocht'schen Malariaplasmodienfärbung, seine Reindarstellung und praktische Verwendung" haben in der Folgezeit von verschiedenen Seiten zum Teil Bestätigung, zum Teil Widerspruch gefunden.

So wurde ganz kurze Zeit nach meiner Publikation im British Medical Journal vom 21. Sept. 1902 von W. B. Leishman, Prof. of Pathology, Army Medical School, Netley eine „Note on a simple and rapid method of producing Romanowsky staining in malaria and other blood films" veröffentlicht. Diese Methode gleicht im wesentlichen

---

1) Vergl. auch Münch. med. Wochenschr. vom 30. Juli 1901, Verhandl. d. Biolog. Vereins zu Hamburg.

der von mir zuerst angegebenen mit dem Unterschiede, daß Leishman zur Lösung des A-Methylenblau-Eosins nicht wie ich Alcohol absolutus, sondern Methylalcohol purissim. Merck benutzte, der ein besseres Lösungsmittel für den Farbstoff darstellt und infolgedessen eine wesentliche Abkürzung der Färbungsdauer im wässerigen Gemisch erlaubt. Zugleich benutzt L. die vorzüglich fixierende Wirkung des Methylalkohols nach der Jenner'schen Methode, indem er die unfixierten Bluttrockenpräparate mit der methylalkoholischen Lösung des Farbstoffes übergießt, eine halbe Minute fixiert und dann mit der Pipette auf dem Objektträger die gleiche Menge destillierten Wassers hinzufließen läßt, wodurch die wirksame, durch Auftreten eines irisierenden Häutchens kenntliche Fällung hervorgerufen wird. Der ganze Fixierungs- und Färbungsprozeß nimmt auf diese Weise etwa 5—6 Minuten in Anspruch.

Leishman nimmt auf meine Veröffentlichungen mit folgenden Worten Bezug:

While this note was in preparation for publication articles on the same object bei Dr. Karl Reuter appeared in the Münch. med. Woch. of July 30, 1901 and in the Centralbl. f. Bakteriol. Vol. XXX. 6, of August 26, 1901. While it is evident, that Dr. Reuter has been working on similar lines, and has also succeedet in isolating the active staining ingredient in Romanowsky's method and applying it as a simple stain, I may briefly indicate a few material points in which his method differs from mine. 1) The employs as a solvent absolute alcohol. 2) A separate process of film fixation occupying „at least one hour" is necessary before staining. 3) The staining process in itself „occupies two to three hours. 4) More elaborate precautions are necessary to avoid precipitation on the film.

Ganz besonders wertvoll für die Beschleunigung des Färbungsprozesses ist die Verwendung des gut lösenden Methylalkohols (acetonfrei purissim. Merck) und ich habe, seitdem die Methode Leishman's publiziert worden ist, mich ebenfalls ausschließlich dieses Lösungsmittels für das A-Methylenblau-Eosin bedient.

Fast übereinstimmend mit den Angaben Leishman's wurde dann im Januar 1902 von James N. Wright M. D. in The Journal of Medical Research. Vol. VII. No. 1: „A rapid method for the differential staining of blood films and malarial parasites" veröffentlicht. Diese Methode unterscheidet sich von der vorhergehenden nur dadurch, daß die Reifung der alkalisch gemachten Methylenblaulösung durch einstündiges Kochen im Dampfsterilisationsapparat erzielt wird. Im übrigen finden sich keine prinzipiellen Unterschiede zwischen diesen beiden Methoden und ich halte die beiden angeführten Publikationen für geeignet, durchaus dasjenige zu stützen resp. zu erweitern, was ich über die A-Methylenblau-Eosinmethode bereits veröffentlicht habe. Es kann meiner Meinung nach nur für den Wert einer praktisch brauchbaren Methode sprechen, wenn drei verschiedene Autoren, unabhängig voneinander auf demselben Wege methodisch vorgehend, ohne prinzipielle Verschiedenheiten zu einigermaßen gleichwertigen Resultaten kommen. Ich sehe mich um so mehr genötigt, dies in der gehörigen Weise zu betonen, als der nunmehr zu erwähnende Bericht Panse's [1]), sowie die in Bd. XXXI.

---

1) Panse, Otto, Chromatinfärbung. (Diese Zeitschrift. Abt. I. Bd. XXX. p. 804.)

Abt. I p. 429. und kürzlich in Bd. XXXII. No. 4. p. 307 von G. Giemsa veröffentlichten „Färbemethoden für Malariaparasiten“ geeignet sind, das von Leishman, Wright und mir mit gutem Erfolg geübte Verfahren in Mißkredit zu bringen, und damit den Wert einer Methode herabzusetzen, die es nach meinen bisherigen Erfahrungen durchaus verdient, wegen ihrer Einfachheit und Sicherheit allgemein für die Färbung von Bluttrockenpräparaten angewendet zu werden.

War es die nach meiner anfänglichen Vorschrift notwendige ziemlich lange Färbungs- und Fixierungsdauer, welche nach Panse's Ansicht die Methode praktisch ungeeignet erscheinen ließ, so glaube ich diesen Uebelstand gehoben zu sehen durch die Verwendung des Methylalkohols als Lösungsmittel, sowie durch die sehr brauchbare und schnelle Fixierung mittels Formalinalkohols. (Die speziellen Vorschriften siehe am Schlusse.) Ich glaube, daß es nach diesen Angaben leicht ist, in sehr kurzer Zeit eine große Reihe von Blutuntersuchungen auf Malaria durchzuführen. Natürlich ist das angegebene Verfahren subtil und verlangt ein sauberes Arbeiten, wie die Romanowsky-Färbung überhaupt, immerhin scheint es mir aber einfacher, mit einer einzigen Lösung zu arbeiten, als mit jedesmaligem Titrieren und Mischen zweier Stammlösungen sich zu befassen. Dieser letztere Uebelstand wird auch durch die von Giemsa neuerdings angegebene Methode nicht völlig beseitigt.

G. ist es gelungen, Methylenazur völlig chemisch rein darzustellen und in den Handel zu bringen. Offenbar ist die Darstellungsmethode schwierig und Sache des Chemikers. Alle bisher als reines Methylenazur angesehenen Produkte dürften nach den Angaben G.'s diese Bezeichnung nicht verdient haben, da es gelungen ist, in ihnen beträchtliche Verunreinigungen nachzuweisen. Ich bin bis jetzt noch nicht im Besitz des käuflichen Farbstoffes und habe mir daher kein Urteil über denselben bilden können. Er stellt nach Giemsa's Untersuchungen den färbenden Bestandteil der Romanowsky-Färbung dar und giebt, mit Eosin gemischt, sämtliche Farbenreaktionen der letzteren. Dabei muß es nun aber auffallen, daß Giemsa zur Färbung der Blutpräparate nicht den reinen Farbstoff, sondern ein Gemisch desselben mit gleichen Teilen Methylenblau empfiehlt. Dieser Umstand beweist, daß bei der Romanowsky-Färbung mit allen ihren Kontrasten und Feinheiten, wie wir sie in praxi verlangen, ebenso die Gegenwart des Azureosins wie des Methylenblaueosins notwendig ist. Ich möchte darauf hingewiesen haben, daß man auch hier immerhin noch an das Zusammentreten dieser beiden Farbstoffe zu einem Doppelsalz, also einem einheitlichen chemischen Körper, denken kann. Vielleicht erklärt sich auch auf diese Weise die immerhin auffallende Differenz zwischen der stöchiometrischen Berechnung und der thatsächlichen quantitativen Zusammensetzung des von Giemsa empfohlenen Farbgemisches, auf die der Autor selbst aufmerksam macht (p. 311).

Ich selbst habe mich durch zahlreiche Versuche überzeugt, daß es bei der Behandlung von Methylenblaulösungen mit verdünnten Alkalien bei erhöhter Temperatur ein Optimum des Reifezustandes giebt, welches in einem bestimmten Abhängigkeitsverhältnis von der Menge und Konzentration der Lösung, Stärke der Alkalescenz, Temperaturgrad und Reifungsdauer steht. Je nachdem einer dieser Faktoren variiert, wird das Optimum mehr oder weniger schnell erreicht resp. überschritten. Es ist somit Sache der technischen Einrichtung und der Uebung, ein

gutes Produkt zu erzielen. Die Firma Grübler & Hollborn hat in der Herstellung des Farbstoffes, soweit ich aus den mir zur Verfügung gestellten Proben schließen darf, das denkbar Beste erreicht, und ich bediene mich am Krankenbette neuerdings des folgenden Verfahrens. Die lufttrockenen Ausstrichpräparate werden durch momentanes Uebergießen mit Formolalkohol (Formol 10,0, Alcohol absol. 90,0) und sofortiges sorgfältiges Abtupfen mit reinem Fließpapier fixiert. (Die ganze Prozedur nimmt 3 Sekunden in Anspruch und giebt für alle mir bekannten Blutfärbemethoden die besten Resultate.) Darauf werden sie in einem geräumigen Schälchen (Deckel eines Petri-Schälchens), mit der im Meßcylinder gemischten Farblösung (Aqua destillata 20,0 ccm + A-Methylenblau-Eosinlösung-Grübler 30 Tropfen) übergossen. Durch Schaukeln des Schälchens wie beim Entwickeln einer photographischen Platte kann man die Ausfällung des Farbstoffes und damit die Färbung des Präparates wesentlich beschleunigen. In 15—30 Minuten ist dieselbe in allen Fällen beendet. Abspülen mit Aqua destillata unter dem Strahle der Spritzflasche, Abtupfen mit Fließpapier, Untersuchen des luftrocken gewordenen Präparates in Balsam oder ohne Deckglas im Immersionsöl bildet den Schluß.

Daß, wie Giemsa behauptet, die methylalkoholische Lösung des Farbstoffes nicht dauernd haltbar ist, davon habe ich mich bis jetzt nicht überzeugen können, eine von mir vor einem Jahre hergestellte und seit dieser Zeit aufbewahrte Lösung färbt zur Zeit noch genau so gut wie am ersten Tage.

Einige neue Apparate zum Schöpfen von Wasser zu bakteriologischen Zwecken.

[Aus dem Institut für Bakteriologie und Hygiene an der Universität Straßburg i./Els. (Direktor: Prof. Dr. Forster.)]

Von Dr. med. **Ernst Meyer**, Assistenten am Institute.

Mit 4 Figuren.

Bei Wasseruntersuchungen kommt es oft darauf an, Wasser steril und aus ganz bestimmten Tiefen zu entnehmen. Den vielen zu diesem Zwecke angegebenen Apparaten möchte ich einige leicht vor dem Gebrauche zu sterilisierende hinzufügen, die sich bei den in unserem Institute ausgeführten Untersuchungen gut bewährt haben und die ich in meiner Dissertation [1]) 1901 zuerst beschrieben habe.

Der erste Apparat (s. Fig. 1) besteht aus einem 2 m langen mit Maßen versehenen Messingstabe, an dessen unterem Ende seitwärts

---

1) Meyer, E., Ueber den Bakteriengehalt der Ill oberhalb der Einmündung der Straßburger Schmutzwässer. [Inaug.-Diss.] Straßburg 1901.

eine runde Platte *b* ist, über welcher sich ein fester Ring *c* befindet. Ueber diesem ist ein Ring *d*, der an einer Oese am Stabe auf- und abbewegt und mittels einer Schraube an demselben in jeder Höhe festgemacht werden kann. Auf die untere Platte wird nun die zu füllende in sterilisiertem Papier eingehüllte Flasche unter Entfernung des Papiers gesetzt; dann wird der Ring *c* soweit herabgelassen, daß er an dem Flaschenhals fest anliegt, und wird in dieser Höhe mittels der vorhin erwähnten Schraube befestigt und ist dann gebrauchsfertig. Mit diesem Apparat wird das Wasser geschöpft, indem der Stab mit

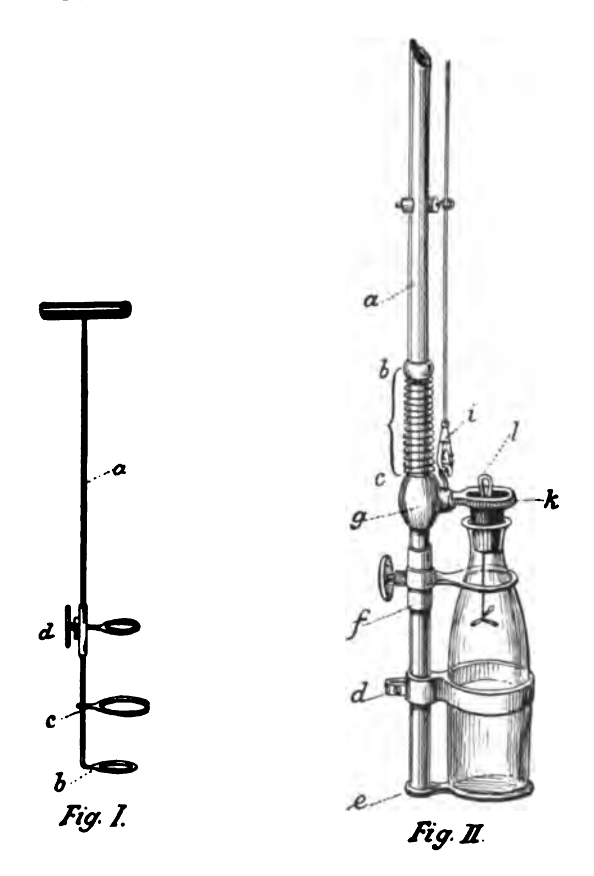


Fig. I. Fig. II.

der Flasche schnell bis zu der gewünschten Tiefe ins Wasser eingetaucht, einige Sekunden (etwa bis zur halben Füllung der Flasche) unten gehalten und dann möglichst schnell in die Höhe gezogen wird, wo der Flaschenhals sofort mit einem sterilisierten Gummistopfen zu verschließen ist. Da jedoch bei diesem Apparat möglicherweise beim Herausziehen auch Wasser aus anderen Tiefen als der gewünschten in die Gefäße gelangen konnte, wurde ein zweiter Apparat konstruiert, der diesen Fehler völlig vermeidet.

Das Instrument (s. Fig. 2 u. 3) besteht aus einer $2^3/_4$ m langen Messingröhre *a*, die sich in 3 Teile zerlegen läßt und so bequem trans-

portabel ist. Um den unteren Teil der Röhre befindet sich von *b—c* eine starke Spirale. An der Stelle *f* ist ein am Stabe beweglicher Ring angebracht, um den Hals der Flasche festzuhalten. Ferner ist in *d* ein fester Ring, in welchem die Flasche fixiert wird, und bei *e* eine Messingplatte, auf welcher die Flasche ruht. In *g* ist am unteren Ende der Spirale ein Haken *i* nebst einer durchbohrten Messingplatte *k* angebracht. An diesem Haken *i* wird mit einem Karabinerverschluß ein Draht befestigt, der durch den Führungsring *h* läuft. Die Flasche ist verschlossen durch einen Gummistopfen, welcher von einer ziemlich langen Schraube durchbohrt ist, deren oberes Ende, eine Oese *l*, durch die durchbohrte Platte *k* hindurchreicht, während ihr unteres Ende in

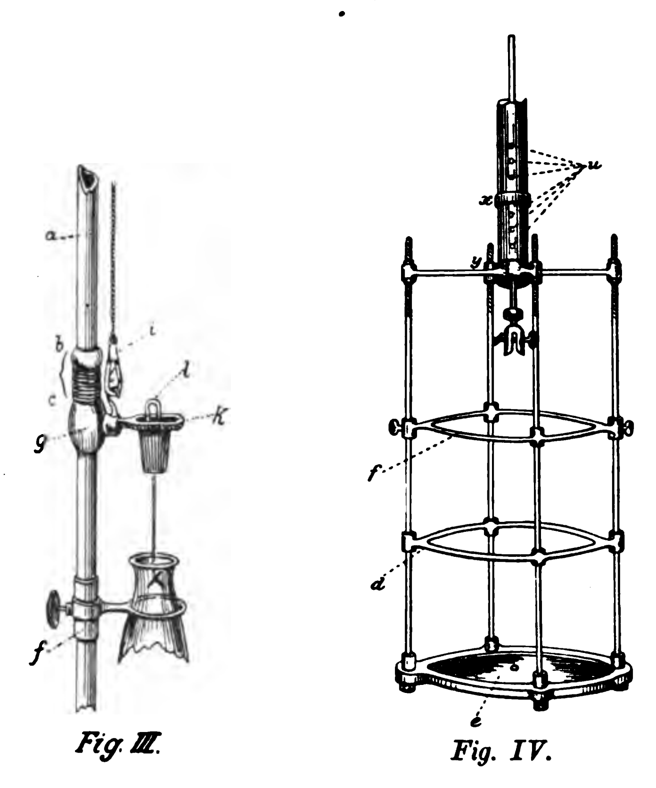


Fig. III. *Fig. IV.*

den Flaschenhals hineinragt. Ist der Apparat mit der Flasche versehen, so wird die Oese *l* quer zu der Platte *k* gestellt und der Apparat bis zu der beabsichtigten Tiefe eingetaucht. Dann wird kräftig an dem Draht gezogen, wodurch der Stopfen von dem Flaschenhals entfernt und gleichzeitig die Feder *b—c* stark zusammengedrückt wird. Hat man dann die Flasche eine Zeit lang unter Wasser geöffnet gehalten, so läßt man den Draht los, worauf durch den Druck der Spirale die Flasche fest geschlossen wird. Hierbei dient die den Stopfen durchbohrende Schraube als Führung für denselben.

Auf Grundlage dieses Apparates wurde dann noch ein dritter von dem Maschinenmeister des hiesigen Wasserwerks, Herrn Gillet, angefertigt, dessen Konstruktion in einigen Punkten von der des oben

beschriebenen abweicht (s. Fig. 4). Der Hauptunterschied ist der, daß während bei dem zweiten Apparat die Führung seitlich ist, bei diesem die Führung eine centrale ist, d. h. daß die Führung durch die hohle Röhre geht und der Draht zum Oeffnen der Flasche aus einem festen Stabe besteht, der ebenso wie die äußere Röhre in mehrere Teile zerlegbar ist, die miteinander durch Muffen verbunden werden können. An dem unteren Ende des Stabes ist dann ein dicker Fortsatz, der tief eingekerbt und an beiden Seiten der Einkerbungen seitlich durchbohrt ist. In diese Kerbe paßt die bei Apparat II beschriebene Oese *l* hinein, die hier durch einen quergesteckten Messingstift festgehalten wird. Die Flasche ruht ebenso wie bei Apparat II auf einer Messingplatte, doch sind die die Flasche haltenden Ringe *f* und *d* infolge der centralen Führung etwas anders angebracht, wie dies ja aus der Zeichnung (Fig. 4) hervorgeht. Die Feder ruht im unteren Teil der Röhre $x—y$. Um das beim Eintauchen in die Röhre hineingelangende Wasser zu entfernen, sind an ihr verschiedene kleine Löcher angebracht (*u*).

Unmittelbar vor dem jedesmaligen Gebrauch werden die Apparate durch Erhitzen in der freien Flamme sterilisiert, dann wird die in steriles Papier eingeschlagene Flasche in den Apparat hineingesetzt, das Papier mit steriler Pincette fortgezogen und die Fußplatte *e* mit der Pincette unter die Flasche geschoben, so daß diese auf *e* ruht.

Zum Sterilisieren verwendet man am besten eine tragbare Benzingebläselampe, wie sie die Spengler beim Löten benutzen.

Inhalt.

Originalmitteilungen.

Frommannsche Buchdruckerei (Hermann Pohle) in Jena.

CENTRALBLATT

für

Bakteriologie, Parasitenkunde und Infektionskrankheiten

Erste Abteilung:

Mediz.-hygien. Bakteriologie u. tier. Parasitenkunde

Originale

In Verbindung mit

Geh. Med.-Rat Prof. Dr. Loeffler, Prof. Dr. R. Pfeiffer, Prof. Dr. M. Braun
Greifswald — Königsberg i. Pr.

herausgegeben von

Dr. O. Uhlworm in Berlin W., Schaperstr. 2/3 I

Verlag von Gustav Fischer in Jena

XXXII. Band. — Jena, den 29. November 1902. — No. 12.

Preis für den Band (50 Bogen) 15 Mark. Schwierige Tafeln werden einem Bogen gleich gerechnet. — Die Nummern erscheinen zwanglos je nach dem vorliegenden Stoffe. Bei Einzelverkauf Preis für einen einfachen Druckbogen 40 Pfg., für eine Tafel 60 Pfg.

Hierzu als regelmäßige Beilage die Inhaltsübersichten der II. Abteilung des Centralblattes.

Die Redaktion des „Centralblatts für Bakteriologie und Parasitenkunde“ richtet an die Herren Mitarbeiter die ergebene Bitte, etwaige Wünsche um Lieferung von besonderen Abdrücken ihrer Aufsätze entweder bei der Einsendung der Abhandlungen an die Redaktion auf das Manuskript schreiben zu wollen oder spätestens nach Empfang der ersten Korrekturabzüge direkt an den Verleger, Herrn Gustav Fischer in Jena, gelangen zu lassen.

Original-Mitteilungen.

Zur Aetiologie der Anginen.

Von Prof. H. Bonhoff.

Wenn wir von der durch den Loeffler'schen Bacillus erzeugten Krankheit absehen, sind bisher hauptsächlich zwei Bakterien-Anginen genauer studiert und häufiger beobachtet worden, die beide sich durch geringe oder Nichtkontagiosität auszuzeichnen scheinen, die sogenannte Streptokokken-Angina und die durch „fusiforme“ Bacillen und Spirochäten hervorgerufene, die von Vincent, Bernheim, Abel u. A. in ihrer Aetiologie genauer beschrieben ist. Was sonst an Krankheitserregern bei Anginen in der Litteratur erwähnt ist, scheint mehr oder weniger zu den Kuriositäten zu rechnen, die des Interesses nicht entbehren, die aber an Häufigkeit weit zurücktreten gegenüber den eben genannten Mikrobien. So hat man in spärlichen Fällen einen bestimmten kleinen

Coccus, der auch als Micrococcus conglomeratus bezeichnet wird, gefunden; ferner Anginen beobachtet, bei denen „vorwiegend“ Staphylokokken oder Pneumokokken, der Micrococcus tetragenus oder der Friedlaender'sche Bacillus in den Deckglaspräparaten und Kulturen gefunden wurden. Man hat Anginen beschrieben, wo sich der Soorpilz primo loco auf dem Isthmus faucium angesiedelt hatte; solche, bei denen neben wenigen Streptokokken große Mengen von „Leptothrix“ vorhanden waren; man kennt eine Angina herpetica, colibacillaris und typhosa.

Häufig beobachtet sind, wie gesagt, nur die beiden oben genannten Formen der Streptokokken-Angina und der durch fusiforme Bacillen bedingten. Beide sind sowohl klinisch wie mikroskopisch-kulturell gut charakterisierte und daher leicht erkennbare Krankheitsbilder. Bei der Streptokokken-Angina haben wir es nach übereinstimmenden Beobachtungen französischer und deutscher Autoren zu thun mit plötzlich auftretenden, verhältnismäßig schweren Allgemeinerscheinungen, die sogar das Bild der echten Diphtherie vortäuschen können: Fieber, Kopfschmerzen, heftigen Halsschmerzen, völligem Darniederliegen des Appetits, damit zuweilen verbunden Albuminurie und selbst Endokarditiden. Der Belag ist meist nicht zusammenhängend, die Schleimhaut darunter wenig gerötet, Ausbreitung des Belages auf Gaumensegel und -bögen selten, Dauer des Belages kürzer als bei Diphtherie, selten über 6 Tage; die Drüsen sind mehr oder weniger geschwollen und druckempfindlich. Ausgang ist meist in Heilung, Rekonvalescenz lange dauernd, Lähmungen sind wohl nicht beobachtet. Es kommen aber auch Fälle vor, in denen sich Septikämieen entwickelten und der Tod eintrat (Mussy). Im Deckglasausstrich und der Kultur finden sich mehr oder weniger frei von Verunreinigungen mit Mundbakterien die Streptokokken, als Diplokokken oder in kürzeren oder längeren Ketten innerhalb wie außerhalb der Zellen gelagert. Je reiner das mikroskopisch-kulturelle Bild ist, d. h. je weniger andere Bakterien vorhanden sind, um so schwerer scheinen die Erkrankungen zu verlaufen. Je mehr andere Mikrobien neben Streptokokken auftreten, um so gutartiger die Erkrankung. Besonders befähigt zur Abschwächung der Streptokokkenwirkung scheint der oben als Coccus conglomeratus bezeichnete Organismus zu sein, der zwar infolge seiner schnellen Vermehrung die Allgemeinerscheinungen noch plötzlicher eintreten läßt, im übrigen aber eine sehr gutartige und zwar mit seiner Anzahl steigend günstige Beeinflussung des Krankheitsverlaufes erkennen läßt. In ähnlicher Weise prognostisch günstig sollen auch neben Streptokokken sich zeigende Staphylokokken, Pneumokokken, Leptothrix anzusehen sein.

Die „Angine à bacilles fusiformes“ ist in ihrem Krankheitsbilde nicht ganz übereinstimmend beschrieben worden. Vincent, dem wir die größte Anzahl von Veröffentlichungen über den Gegenstand verdanken, unterscheidet eine diphtherieähnliche und eine ulcero-membranöse Form. Bei der ersteren findet sich auf oberflächlich exulcerierter Schleimhaut eine zusammenhängende Pseudomembran, die einige Tage besteht, das geringe Fieber dauert 3 Tage; die Unterkieferdrüsen sind geschwollen. Bei der zweiten Form bildet sich vom 3. Tage der Erkrankung an ein mehr oder weniger tiefes Geschwür unter der oft stärker ausgebreiteten Pseudomembran aus, die Schlingbeschwerden sind, zum Teil auch infolge stärkerer Schwellung der Rachenschleimhaut, sehr ausgesprochen, das Fieber ist auch hier gering, die Drüsenschwellungen zuweilen stärker

ausgebildet. Die Dauer der Erkrankung ist etwas länger, 8 Tage, bisweilen mehrere Wochen bis zu 2 Monaten. Mikroskopisch-kulturell ist nach Vincent die diphtheroide Form ausgezeichnet durch fast alleiniges Vorhandensein spindelförmiger, d. h. in der Mitte dickerer, an den Enden zugespitzter, 8—12 μ langer, zuweilen deutlich gekrümmter Bacillen, die besonders in den mittleren Teilen der Pseudomembranen sich in enormen Mengen finden. Bei der ulcero-membranösen Form sind, zumal in den oberflächlich, nach dem Racheninneren gelegenen Teilen der Pseudomembran neben diesen Bacillen mehr oder weniger reichlich Spirillen vorhanden, die der bekannten Spirochaeta dentium aufs Haar gleichen. Beide, Bacillen und Spirillen, sind Gram-negativ und nicht züchtbar.

Mit dieser Beschreibung Vincent's stimmt im allgemeinen überein, was deutsche Autoren über diese Art von Anginen und ihre Erreger geschrieben haben. Bernheim hat zuerst darauf aufmerksam gemacht, daß es sich bei dieser Art von Anginen wahrscheinlich nur um eine besondere Lokalisation der Stomakace, der Stomatitis ulcerosa, handelt. Zu bemerken bleibt noch, daß auch diese Form der Angina, wenn auch selten, ansteckend sein kann, wie 3 Beobachtungen Bernheim's und eine von Plaut zu beweisen scheinen.

Mit dem hier in kurzer Uebersicht Mitgeteilten ist so ziemlich dasjenige erschöpft, was wir Sicheres über die Aetiologie der nicht diphtherischen Anginen wissen. Es bleibt noch viel zu thun, um etwas mehr Licht in das Chaos dieser Erkrankungen zu bringen, vor allem über diejenige Gruppe von Anginen Genaueres zu erfahren, die durch exquisite Kontagiosität ausgezeichnet sind. Immer wieder taucht dabei dem Untersucher der Gedanke auf, daß neben den nachweisbaren Bakterien andere vorläufig unserer Erkenntnis nicht zugängliche Gebilde vorhanden sein könnten, auch in den Fällen, in denen eine Häufung eines bestimmten Mikroben sich findet. Alle darauf gerichteten Bemühungen, etwas derartiges Nichtbakterielles in dem Krankheitsprodukt wenigstens mikroskopisch nachzuweisen, sind mir bisher erfolglos geblieben.

Daß es solcher Fälle giebt, die deutliche Ansteckung zeigen, ist meiner Ansicht nach nicht zu bezweifeln, und ihre Aetiologie scheint mir durch die oben erwähnten seltenen Beobachtungen, in denen sicher durch Streptokokken oder fusiforme Bacillen die Ansteckung erfolgte, keineswegs genügend aufgeklärt zu sein. Natürlich zwingt uns vorläufig nichts, anzunehmen, daß es sich in allen solchen Fällen um ein einziges, um immer das gleiche ätiologische Moment handeln müsse. Es ist mir vielmehr sehr wahrscheinlich, daß den verschiedenen Epidemieen und Endemieen von Anginen an verschiedenen Orten und zu verschiedenen Zeiten auch differente Erreger zu Grunde liegen können. Jedenfalls aber werden wir jede Mitteilung nach dieser Richtung mit Sorgfalt zu prüfen haben.

In den Wintermonaten des letzten Jahreswechsels nun kam in Marburg und nächster Umgebung eine nicht unbeträchtliche Anzahl von Anginen bei Erwachsenen und Kindern zur Beobachtung, von denen ein gewisser Teil durch hervorragende Kontagiosität sich auszeichnete. Ich habe selbst verschiedentlich beobachtet, daß Geschwister einander ansteckten und ein Gleiches ist mir auch von den Herren Kollegen, die Praxis hier ausüben, mitgeteilt worden. Es war mir daher von besonderem Interesse, zu versuchen, ob sich nicht in diesen Fällen ein

spezifischer Krankheitserreger nachweisen ließe. Dies Interesse wuchs, als sich bald zeigte, daß weder auf fusiforme Bacillen noch auf Streptokokken noch auf sonstige bekannte Bakterienarten die Aetiologie dieser Fälle zurückgeführt werden könne.

Was zunächst die klinischen Erscheinungen der betreffenden Fälle von Anginen angeht, so läßt sich kurz sagen, daß dieselben ausgezeichnet waren durch ziemlich stark hervortretende Allgemeinerscheinungen im Beginne der Erkrankung, hohes Fieber, bis 40° und etwas darüber in den ersten Tagen, heftige Kopfschmerzen, starke Schlingbeschwerden und überhaupt das Gefühl des Schwererkranktseins. Diesem Gefühl schwerer Erkrankung entsprach meist nicht der Befund im Rachen, der sich oft auf einige Pfröpfe auf den Lakunen der Mandeln beschränkte und bei dem es scheinbar selten zu ausgebreiteteren Membranen kam. Die subjektiven Beschwerden verminderten sich stets wesentlich, sobald das Fieber herabging, was meist schon am 3. oder 4. Tage der Erkrankung eintrat. Die Rekonvalescenz war im allgemeinen sehr kurz; irgend welche Nachkrankheiten scheinen nicht beobachtet zu sein.

Die Untersuchung des fraglichen Materials geschah zunächst in einigen Fällen in der Besorgnis, daß es sich um Diphtherie handeln könne. Das Material wurde dadurch erhalten, daß im Institute sterilisierte Schwämmchen zum kräftigen Abwischen der erkrankten Stellen benutzt und dann sofort in sterilem Reagensglas oder sterilem Papier an mich abgeschickt wurden. Die mikroskopische und kulturelle Prüfung des eingesendeten Rachenbelages erschien nicht ausreichend, vielmehr wurde in allen Fällen, nach Anfertigung einiger Deckglaspräparate und Anlegung von Blutserum- und Agarkulturen, das Schwämmchen einem jugendlichen Meerschweinchen von ca. 250 g Gewicht subkutan unter die Haut am Bauche verimpft, die Wunde sorgsam zugenäht und durch einen kleinen Watte-Kollodiumverband für festen und völligen Abschluß der gesetzten Wunde nach außen hin Sorge getragen. Die mikroskopischen Präparate wurden mit Loeffler's Blau, Biondi und einem Eosin-Methylenblau-Methylenazurgemisch gefärbt, die Kulturen auf Blutserum und Agar in den nächsten Tagen auf Diphtheriebacillen und die verschiedenen Kokkenarten genau untersucht und endlich die Veränderungen an der Impfstelle der Meerschweinchen genau beobachtet. Meist entwickelte sich innerhalb mehrerer Tage eine deutliche Infiltration, die an späteren Tagen — häufig durch die Ränder der gesetzten Wunde hindurch — zur Abscheidung von Eiter führte, welcher kulturell und mikroskopisch untersucht wurde. Zuweilen gelang es, die unten genauer zu beschreibende Bacillenart schon aus dem Infiltrat der ersten Tage oder aus diesem Eiter des erstgeimpften Tieres herauszuzüchten und zwar auch dann, wenn dieselbe auf den vom Schwämmchen angelegten Kulturen nicht mit Sicherheit gesehen worden war. In seltenen Fällen aber ließ sich in dem Eiter an der Impfstelle des ersten Tieres auch nach mehrtägiger kultureller Untersuchung die Bakterienart nicht erhalten auf künstlichem Nährboden, selbst dann, wenn sie auf den mit dem Schwämmchen direkt geimpften Agar- und Blutserumröhrchen in einigen Kolonieen vorhanden war. In diesen Fällen wurde der Eiter des ersten Tieres, mit etwas steriler Bouillon verdünnt, einem zweiten Tiere subkutan eingeimpft, und wenn sich auch bei diesem ein kultureller Mißerfolg ergab, eventuell noch ein drittes und viertes Tier mit dem Eiter des vorhergehenden eingespritzt. Dabei wurde sorgsam darauf geachtet, daß nicht von außen irgend Bakterienmaterial in die Wunde

gelangte; auch wurde durch Wechsel der Ställe, Reinigung und Desinfektion derselben nach Gebrauch eine Uebertragung von Mikroorganismen von einmal infizierten Gegenständen der Umgebung her nach Möglichkeit ausgeschlossen.

Es sind im ganzen 20 Fälle der in diesen Wintermonaten beobachteten Anginen bakteriologisch genau untersucht worden. Dieselben waren gleichmäßig über die ganze Stadt verteilt, wurden zum Teil auch in nächster Umgebung von Marburg beobachtet. Alle Fälle verliefen gutartig, sie betrafen mit wenigen Ausnahmen erwachsene Personen im Alter zwischen 20 und 30 Jahren. Vorweg sei bemerkt, daß nur in einem einzigen Falle echte virulente Diphtheriebacillen nachgewiesen wurden und zwar bei einer Dame, die ganz gewiß nicht an Diphtherie erkrankt war und bei der die Symptome und der Verlauf der Krankheit sich in nichts von den anderen Fällen unterschieden. Trotz unterlassener Desinfektion hat eine Uebertragung von Diphtherie durch die Patientin nicht stattgefunden, und ich glaube mich berechtigt, anzunehmen, daß neben dem eigentlichen Krankheitserreger, dem unten zu beschreibenden Bacillus, sich einige wenige Diphtheriebacillen in dem Rachensekret befunden haben, die bei der genauen Art der Untersuchung (Tierversuch) sich sofort bemerklich machten, während sie auf den Original-Agarausstrichen nicht zu finden waren.

Auch Pseudodiphtheriebacillen habe ich nur in einem der 20 Fälle, dazu in spärlicher Zahl, gefunden.

Den fusiformen Bacillen bin ich in keinem der im Winter von mir untersuchten 20 Fälle begegnet. Wohl kamen auf den Präparaten zuweilen neben den etwaigen Spirochäten einige schwach gekrümmte, lange, in der Mitte dickere, an den Enden zugespitzte Stäbchen zur Beobachtung, aber immer in äußerst geringer Zahl; und wir wissen ja, daß diese Formen auch in normalem Speichel bezw. Zahnfleischabsatz sich reichlich finden können, besonders bei Personen, die auf Pflege der Zähne und Reinlichkeit des Mundes wenig Achtsamkeit verwenden.

Streptokokken ließen sich meist, wenn auch nicht immer, in den Präparaten und den Kulturen finden. Sie waren aber auch niemals in so überwiegender Zahl gegenüber den anderen Mundbakterien vorhanden, daß man geneigt gewesen wäre, auf ihre Wirkung allein die Erkrankung zu basieren. Das Gleiche gilt von anderen Kokken, die hier in Betracht kommen könnten.

Auf den Deckglaspräparaten fanden sich sehr häufig neben anderen Bakterien kleine Bacillen in kleinen Häufchen zusammenliegend, die ich im Folgenden genauer beschreiben will. Es sei jedoch gleich hier darauf hingewiesen, daß ich nicht etwa durch die mikroskopischen Präparate auf diese Bacillen aufmerksam wurde, sondern daß ich dieselben erst ziemlich spät in den Deckglaspräparaten gesehen habe. Sie sind mir niemals in so überwiegender Menge in diesen Ausstrichen begegnet, daß ich mich hätte berechtigt fühlen können, sie auch nur als hauptsächlich oder in größter Zahl vorkommende Bakterienart anzusprechen. Zu meinem lebhaften Bedauern ist es mir trotz darauf gerichteter Bemühungen auch niemals gelungen, ein einigermaßen zusammenhängendes Membranstückchen zu erhalten, das ich hätte härten und schneiden können. Ich bin deshalb auch nicht in der Lage, eine Mitteilung darüber zu machen, ob sich in den Pfröpfen bezw. Pseudomembranen die Stäbchen in größerer Zahl und in besonderer Lagerung

finden — ein großer Mangel hinsichtlich der Beurteilung, auf den ich noch zurückzukommen haben werde.

Erhalten wurden diese Bacillen zuerst aus dem Infiltrat, das sich bei Meerschweinchen an der Stelle, an welcher das Schwämmchen subkutan am Bauche untergebracht wird, bis zum 2. Tage entwickelt. Später, nach gewonnener Erkenntnis des charakteristischen Aussehens der Kolonieen auf Agar, habe ich dieselben oft, aber durchaus nicht immer, auch auf den Originalausstrichen der Pfröpfe auf Agar, meist jedoch nur in spärlicher Zahl gefunden. Ueber die Häufigkeit des Vorkommens dieser Bacillen im Eiter der Impfstelle bei Meerschweinchen sei später berichtet. Hier soll zunächst eine Beschreibung des Mikroben in morphologischer und biologischer Hinsicht folgen.

Im hängenden Tropfen 24-stündiger Bouillonkultur zeigen sich die Bacillen deutlich als solche, d. h. mit überwiegendem Längsdurchmesser; sie liegen nur zum Teil einzeln, größtenteils in Fäden von 3—5 Gliedern. Die Länge der kleinen, eben aus der Teilung hervorgegangenen Formen beträgt 2, die der größeren 3—3,5 μ, die Breite ungefähr 0,6 μ. Eigenbewegung ist nicht vorhanden. Die einzeln liegenden Formen tanzen zwar lebhaft hin und her, drehen sich auch plötzlich um Quer- oder Längsachse, machen wohl auch geringe seitliche Bewegungen. Die in Fäden angeordneten schlagen mit dem Ende des Fadens vielfach seitlich aus. Ein richtiges von der Stelle Sichbewegen aber, ein Verschwinden aus dem Gesichtsfeld bei den am Rande desselben gelegenen Gebilden ließ sich niemals beobachten; auch nicht einige Zeit nach der Fertigstellung des Tropfens. Die einzeln liegenden Stäbchen zeigen oft, besonders die längeren, eine schwache Krümmung über die Längsachse; in Teilen von Fäden sieht man zuweilen auch etwas wie S-Formen angedeutet. Der Inhalt der Bakterienzelle ist bei der Bouillonkultur völlig homogen, gleichmäßig schwach lichtbrechend, irgend welche Besonderheiten nicht zu sehen.

In 24-stündiger Peptonwasserkultur finden sich einzelne Glieder sehr spärlich, meist Ketten von 8—10—14 Gliedern. Da die Einzelform in diesem Nährboden viel kürzer ist als die in Bouillon, sehen die Fäden fast genau aus wie Streptokokken. Die einzelnen Glieder haben entweder eine helle Stelle in der Mitte oder eine Einschnürung, ich vermag nicht mit Sicherheit zu entscheiden, was es ist. Jedenfalls wird auch dadurch der Eindruck von Streptokokken erhöht. Bezüglich der Eigenbewegung gilt das oben bei der Bouillonkultur Gesagte auch hier.

Im Kondenswasser der Agarröhrchen sind beide, die in Bouillon beobachteten längeren, deutlich stäbchenförmigen Gebilde und die mehr Diplokokken ähnelnden kürzeren vorhanden.

Das Verhalten gegenüber Färbemethoden ist folgendes: Agarkulturen färben sich mit kalt 5 Minuten einwirkendem Loeffler'schen Blau sehr schwach blau, mit kurz angewärmter Loeffler'scher Lösung färben sich Traubenzuckeragarkulturen sehr kräftig blau; die Stäbchen erscheinen hier sehr groß und breit. Mit Loeffler warm gefärbte Präparate der Bouillonkulturen zeigen spärlich kurze Stäbchen, wie Diplokokken aussehend, da sie eine schmale, helle Lücke zwischen den kräftig gefärbten Enden haben; sehr reichlich sind lange Stäbchen und Fäden vorhanden, die meist ziemlich lange, farbfreie, eiförmige Stellen, fast wie Sporen aussehend, im Inneren haben.

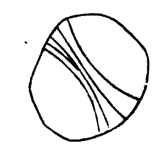
Milch- und Kartoffelkulturen zeigen die einzeln liegenden Stäbchen mit warmer Loeffler'scher Lösung kaum blaßblau gefärbt; in ihnen

aber liegen, und zwar scheinbar in jeder Zelle, 1—3 dunkel gefärbte Körner an den Enden oder in der Mitte oder an beiden Stellen.

Die Gram'sche Methode hat, mit Agarkulturen angestellt, immer negative Resultate ergeben, glatte Entfärbung.

Die Frage, ob der Bacillus Sporen bildet, ist mit Sicherheit nicht entschieden, da einzelne meiner Resistenzversuche mit den übrigen nicht übereinstimmende Resultate ergeben haben. Jedenfalls ist niemals ein Auskeimen der oben erwähnten hellen Stellen in der Mitte der Bacillen oder auch nur ein Freiwerden dieser hellen Stellen unter Schwinden des übrigen Teiles des Bacillus bisher beobachtet worden. Ich glaube vorläufig nicht, daß eine Sporenbildung besteht.

Das Wachstum dieses „Anginabacillus" auf künstlichen Nährböden ist derart, daß es jederzeit gelingen wird, ihn an demselben wiederzuerkennen. Zunächst erfolgt eine Vermehrung überhaupt nur bei höheren Temperaturen, am besten bei 37° C. In Gelatinestichen und auf Agarröhrchen, schräg erstarrten, die auf dem Brütschrank, also ungefähr bei 21° C gehalten wurden, habe ich bisher eine Vermehrung niemals beobachtet. Sehr charakteristisch ist das Aussehen der 48-stündigen Agaroberflächenkolonie, wenn man dieselbe bei schwacher Vergrößerung unter dem Mikroskop betrachtet. Die Kolonieen sind verschieden groß, derart, daß sich Größenangaben eigentlich kaum geben lassen, scharf kreisrund und von schwach gelblicher Farbe. Das Wesentliche nun ist, daß man bei diesen 48-stündigen Kolonieen fast immer eine sehr eigentümliche Faltenbildung beobachtet, die wahrscheinlich der Ausdruck ist für eine schon zu dieser Zeit stattfindende Austrocknung der oberflächlichsten Schichten der Kolonie. Entweder ziehen von irgend einer Stelle des Randes der Kolonie zum gegenüberliegenden Rande vier oder mehr feine Linien in sanft geschwungenem Bogen, so daß die Falten also nicht parallel verlaufen, sondern in der Mitte der Kolonie näher aneinander liegen, etwa so, wie es nebenstehendes Schema zeigt; oder es ist eine größere oder geringere Anzahl konzentrischer Linien im Inneren der Kolonie vorhanden; oder nur einzelne Teile der Oberfläche sind von der Faltenbildung befallen; oder die Falten sind ganz unregelmäßig in Winkeln, Dreiecken etc. angeordnet. An 24-stündigen Kolonieen ist von dieser Eigentümlichkeit nichts zu erkennen, diese 24-stündigen Kolonieen würde ich von Streptokokkenkolonieen, da sie meist sehr klein und tautropfenähnlich sind, nicht unterscheiden können. Für das bloße Auge sind auch nur die älteren Kolonieen charakteristisch. Sie erscheinen als verschieden große, silbergraue Kolonieen mit trockener Oberfläche und eigentümlich stumpfem, bei schräg auffallendem Licht zuweilen opalescierendem Aussehen. In Bouillon tritt nur eine geringe gleichmäßige Trübung ein; ebenso in Peptonwasser. In Traubenzuckeragar erfolgt Wachstum längs des ganzen Stiches ohne Gasbildung. Auf Blutserum finden sich uncharakteristische, zarte, tautropfenähnliche Kolonieen, die nicht verflüssigen. Auf Kartoffeln findet ein sichtbares Wachstum nicht statt; Milch wird nicht verändert. Indolbildung aus Pepton fehlt. Gelatineröhrchen, bei 37° nach der Impfung gehalten, zeigen kräftiges Wachstum, kommen aber bei Zimmertemperatur wieder zur Erstarrung. Die Gelatine wird also nicht verflüssigt.



Der Bacillus scheint zunächst, aus der Mundhöhle des Menschen kommend, eine hohe Pathogenität für unsere gewöhnlichen Versuchs-

tiere nicht zu besitzen. Er erregt nur Infiltrat, Eiterung, eventuell Hautnekrose an der Impfstelle, alles ausgehend in Heilung. Wenn man aber den Eiter unter allen Kautelen subkutan weiter verimpft auf dieselbe Tierart (Meerschweinchen), so sterben dieselben auch an der subkutanen Infektion, zunächst nach etwa 10, in späterer Generation nach 3 Tagen und schließlich nach 24 Stunden. Die aus solchen schnell eingegangenen Tieren gewonnenen Kulturen habe ich auf ihre Virulenz auf Kaninchen, Meerschweinchen und weiße Mäuse geprüft und letztere nicht unerheblich gefunden; jedenfalls höher als die Virulenz von Kulturen, die, ohne den Tierkörper passiert zu haben, direkt aus der Mundhöhle auf künstlichem Nährboden erhalten waren.

Mit den virulenten Kulturen lassen sich Kaninchen von der Bauchhöhle, der venösen Blutbahn her leicht töten; bei großen Dosen (eine Agarkultur) starben die Tiere innerhalb 24 Stunden und zeigen in beiden Verimpfungsarten exsudative Peritonitis und Ergüsse in Brusthöhle und Herzbeutel ohne sonstige Organveränderungen. Aus allen Flüssigkeiten und dem Blut lassen sich die Bacillen mit Leichtigkeit wiedergewinnen.

Weiße Mäuse starben bei Verimpfung geringer Mengen ($^1/_{20}$ Agarkultur) in die Bauchhöhle innerhalb 24 Stunden und zeigen auffallenderweise keine Spur von Peritonitis, überhaupt nichts, als eine ziemlich stark vergrößerte Milz, auffallend groß für die kurze, von der Impfung bis zum Tode verflossene Zeit. Auch bei subkutaner Impfung größerer Dosen ($^1/_2$ Agarkultur) gehen die Mäuse ein an der Infektion, aber erst nach erheblich längerer Zeit, nach 3—4 Wochen, ohne Veränderungen an der Impfstelle oder in den inneren Organen zu zeigen, mit Ausnahme wieder der Milz, die auch hier stark vergrößert ist und enorme Dimensionen annehmen kann.

Um Meerschweinchen mit den virulenten Kulturen von der Bauchhöhle aus zu töten, bedarf es großer Mengen, nicht unter einer Agarkultur. Die Tiere sterben dann allerdings in etwa 24 Stunden mit dem Befunde exsudativer Peritonitis und mit zahlreichen Bacillen in der Bauchhöhle, spärlichen im Blut. Bei subkutaner Impfung der Kulturen sind gleichfalls große Dosen erforderlich, die Tiere gehen erst nach 10 Tagen bis 3 Wochen ein, zeigen eventuell noch etwas Eiter an der Impfstelle, vergrößerte Inguinaldrüsen, eine Spur freier Flüssigkeit in der Bauchhöhle, eine kleine, auffallend hellrote Milz und fleckig gerötete Nebennieren. Immer findet sich dabei ferner im Herzbeutel ein reichliches seröses Transsudat, während die Pleuren stets frei bleiben. Die Bacillen habe ich in diesen Fällen immer nur in äußerst geringer Zahl aus dem Eiter der Impfstelle und den Spuren Flüssigkeit in der Bauchhöhle erhalten. Herzblut und Herzbeutelinhalt waren stets frei davon. Auffallend ist also, daß bei subkutaner Impfung von **Kulturen** der Tod der Tiere so langsam, erst nach Wochen, eintritt, während bei subkutaner Impfung des **Eiters** der Tod nach 24 Stunden eintreten kann. Das spricht dafür, einmal, daß auf künstlichem Nährboden eine schnelle Abschwächung der Virulenz eintritt und zweitens wohl auch dafür, daß mit dem Eiter fertig gebildete giftige Substanzen in größerer Menge mitübertragen werden, die den schnelleren Eintritt des letalen Ausganges herbeiführen.

Erwähnenswert erscheinen mir hier noch zwei Arten von Uebertragung, die ich einige Male ausgeführt habe, und zwar vor allem hinsichtlich der ätiologischen Beurteilung der Bakterienart, auf die ich weiter unten zurückkommen werde. Ich habe Meerschweinchen ver-

schiedentlich an den Gaumenbögen Verletzungen der Schleimhaut beigebracht und mit frischem Kulturmaterial dick bestrichen, ohne jeden Erfolg. Ferner habe ich Kaninchen tracheotomiert und auf den verletzten Rand der Trachealschleimhaut und in die Trachea hinein abgekratztes Material von Agarkulturen gebracht. Die Tiere starben nach tadelloser Verheilung der Haut- und Weichteilwunde am 4. Tage nach der Impfung und zeigten auf der nicht verheilten Trachealwunde die Knorpel auf der Außenfläche, dick belegt mit einem fetzigen pseudomembranösen Material, während die Schleimhaut der Trachea, wie alle anderen Organe völlig intakt war. Aus dem Eiterbelag der Knorpel entwickelten sich die verimpften Bacillen reichlich, nicht aus verschiedenen Proben des Herzbluts.

Es bleibt nur übrig, darauf hinzuweisen, daß dieser Bacillus in Bouillonkulturen giftige Stoffwechselprodukte erzeugt, die Meerschweinchen bei intraperitonealer Impfung von 5 ccm einer sterilen, 6 Wochen alten, zwar nicht filtrierten, aber durch Sedimentieren völlig klar gewordenen Probe innerhalb weniger Stunden unter starker Temperaturerniedrigung töten. Bei der Sektion fand sich eine beträchtliche Menge gelblich gefärbter, dünner Flüssigkeit in der Bauchhöhle, vielfache Verwachsungen der Bauchorgane, membranöse Fetzen auf Leber, Milz und Därmen. Die Milz erschien auch hier immer auffallend hellrot, die Nebennieren, vielleicht nur durch Injektion der Gefäße, schwach rötlich. Außerdem war immer seröser Erguß in Pleuren und Perikard vorhanden. Sämtliche Körperflüssigkeiten erwiesen sich als völlig steril.

Was die Beurteilung der im Vorstehenden beschriebenen Bakterienart betrifft, so bin ich geneigt, dieselbe in ätiologischen Zusammenhang mit den in diesem verflossenen Winter so häufig hier beobachteten Fällen von Angina bei Erwachsenen zu bringen. Ich bin allerdings nicht in der Lage, den strikten Beweis für diese Anschauung zu liefern. Für die Bedeutung des „Anginabacillus" als Erreger sprechen meines Erachtens folgende Umstände: 1) die Thatsache, daß ich den Mikroorganismus in sämtlichen im Wintersemester von mir untersuchten Fällen gefunden habe; seit Ende März 1902 habe ich ihn bei weiteren häufigen nach derselben Methode ausgeführten Untersuchungen stets vermißt. 2) Die Feststellung, daß der Bacillus bei Kontrolluntersuchungen auf der Rachenschleimhaut gesunder Personen stets vermißt wurde. Auf diesen Punkt möchte ich besonderes Gewicht legen, während ich der Affindung des Mikroben auf normaler Rachenschleimhaut aus bekannten Gründen eine besondere Bedeutung gegen die ätiologische Rolle des Bacillus nicht hätte zubilligen können. Ich muß hier erwähnen, daß ich den oben beschriebenen Mikroorganismus in einem Falle doch isoliert habe aus dem Nasensekret eines in hiesiger medizinischer Klinik liegenden Patienten, bei dem ich gebeten war, wegen Rotzverdachts eine genaue Untersuchung des Nasensekretes vorzunehmen. Es handelte sich schließlich wohl um eine centrale Pneumonie, gewiß nicht um Rotzinfektion — jedenfalls fanden sich auf den Agarausstrichen des Nasensekretes und in dem Eiter des damit subkutan geimpften Meerschweinchens die oben beschriebenen Bacillen neben Fraenkel'schen Pneumokokken in verhältnismäßig großer Zahl. Ob Rachenerscheinungen bei dem Patienten vorhanden waren, ist mir nicht mehr erinnerlich. 3) Die biologischen Eigenschaften des Mikroben, sein Wachstum nur bei höheren Temperaturen, seine Pathogenität für Versuchstiere, die Bildung von giftig wirkenden Stoffwechselprodukten, endlich die Ab-

schwächung der Virulenz und das schlechte Gedeihen auf künstlichem Nährboden. Um den strikten Beweis für die ätiologische Bedeutung des „Anginabacillus" zu führen, wäre, außer der Impfung am Menschen, die man ja nicht ausführen kann, nötig gewesen, etwas Weiteres über die Lagerung des Mikroben in den Flocken der Mandellakunen beizubringen. Ich bin dazu, wie oben schon erwähnt, nicht imstande, zum Teil wohl deshalb, weil die pathogene Wirkung des Bacillus über die Erzeugung leicht zerfallender Fetzen nicht hinausgeht; echte härt- und schneidbare Pseudomembranen werden nicht gebildet. Vielleicht hätte ich noch versuchen können, im Blute der Kranken und Rekonvalescenten irgend spezifische Wirkungen auf meine Kulturen zu erhalten. Ich habe daran wiederholt gedacht und es auch zuweilen zu erreichen gestrebt. Da es sich aber um lauter Patienten bezw. Kollegen handelte, die für derartige Blutentnahmen unzugänglich sind, bin ich nicht in der Lage, etwas über diese Verhältnisse auszusagen.

Ich kann also den Beweis, daß der beschriebene Mikrobe der Erreger der hier im Winter beobachteten Anginen war, nicht ganz erbringen. Wenn ich aber zum Schlusse noch darauf aufmerksam mache, daß die Krankheitsfälle sich über die ganze Stadt ziemlich gleichmäßig verteilen, daß auch in der Kaserne des hiesigen Jägerbataillons Erkrankungen mit diesen Bacillen vorgekommen sind, daß ferner in abgelegenen Anstalten, wie z. B. in der Landesirrenanstalt bei Cappel spärlich Anginen mit diesen selben Mikroben vorkamen, so wird wohl eine solche starke und gleichmäßige Verteilung des Materials in etwas wenigstens für die Beurteilung hinsichtlich der ätiologischen Bedeutung des Mikroben mit herangezogen werden können.

Vielleicht läßt sich der „Anginabacillus" bei Berücksichtigung der oben geschilderten Methodik des Nachweises auch anderwärts finden. Erst dann würde man sich für berechtigt halten können, demselben in der That ursächliche Beziehungen zu einem Teil der Anginen zuzuschreiben.

Sauerstoffübertragende Körnchen in Milzbrandbacillen.

[Aus dem pathologischen Institute zu Tübingen (Vorstand: Professor Dr. von Baumgarten).]

Von Privatdocent Dr. **A. Dietrich** und Dr. **G. Liebermeister.**

Der feinere Bau der Bakterienzelle ist bereits der Gegenstand vieler Untersuchungen und Arbeiten gewesen. Ein Teil derselben, ausgehend von tinktoriell erzeugbaren Verschiedenheiten, bemüht sich, über das umstrittene Vorhandensein eines Kernes in den Bakterien Aufschluß zu gewinnen oder die Beziehungen der differenzierbaren Zellbestandteile zu Sporenbildung, Virulenz und Charakterisierung der Art festzustellen. Es sind die hierher gehörenden Arbeiten der letzten Jahre teils in diesem Centralblatt veröffentlicht worden [z. B. Marx und Woithe (1), Krompecher (2), Ernst (3)], teils in den diesen Abhandlungen beigefügten Litteraturverzeichnissen citiert, so daß eine Besprechung der umfangreichen Litteratur einer späteren, ausführlichen Mitteilung vorbehalten werden kann.

Auch die zweite Gruppe der Untersuchungen über Morphologie der Bakterien wollen wir nur kurz erwähnen, zuerst und vorwiegend von botanischen Autoren ausgeführt [A. Fischer (4), Arthur Meyer (5) u. A.], welche die Bakterien mit verwandten Gruppen des Pflanzenreiches (Cyanophyceen, Schimmelpilzen etc.) in Vergleich stellen und auf Grund mikrochemischer Reaktionen zu Schlüssen über die Natur vieler Zellbestandteile gelangen. Sie lehrten uns die Uebereinstimmung der Bakterienzelle mit den Zellen höherer Pflanzen, ihre Zusammensetzung aus Membran, wandständigem Protoplasten und Zellsafträumen, sie erkannten viele der sichtbaren Einschlüsse als Reservematerialien, entweder als Stärke oder stärkeähnlicher Substanz, Fette oder auch als Substanzen unbekannter, eiweißähnlicher Natur. Die letzte Arbeit dieser Richtung ist von Grimme in diesem Centralblatt (6) erst kürzlich veröffentlicht worden, wir wollen uns daher auch begnügen, auf sie zu verweisen.

Als Grimme's umfangreiche Mitteilungen erschienen, hatten wir bereits eine Reihe von Untersuchungen so gut wie abgeschlossen, die sich auch damit beschäftigten, die Natur einiger sich in bestimmter Weise charakterisierenden Bestandteile des Bakterienleibes zu bestimmen. In mancher Hinsicht werden unsere Resultate die Ergebnisse Grimme's und seines Lehrers A. Meyer bestätigen und ergänzen, vielfach aber werden wir die Folgerungen, auch die Beweiskraft ihrer Reaktionen einschränken und modifizieren müssen.

Wir haben vorwiegend mit dem Milzbrandbacillus gearbeitet, als der größten pathogenen Art, die zugleich morphologisch und kulturell gut charakterisiert und bequem zu züchten und zu beobachten ist. Auch dient der Bacillus anthracis meist als Untersuchungsobjekt, um den Einfluß bakterientötender oder -lösender Substanzen auf die Bakterienzelle zu studieren, es mußte daher dankenswert erscheinen, über den normalen Bau dieses Bacillus bezw. über seine Veränderungen unter den Einflüssen der verschiedenen Kulturmedien und in den einzelnen Wachstumsperioden tieferen Einblick zu gewinnen, ohne welchen Veränderungen unter pathologischen Verhältnissen exakt nicht beurteilt werden können.

Milzbrandbacillen im infizierten Tierkörper, ebenso in ganz junger Bouillonkultur erscheinen selbst bei stärksten Vergrößerungen durchaus homogen. Aber in Kulturen treten bald, rascher auf oberflächlichen Agarkulturen, später in Bouillon, kleine Körnchen im Inneren des Leibes auf, eines oder mehrere auf ein Glied des Fadens, welche mit der Zeit größer werden und bei geeigneter Einstellung durch stärkeren Glanz auffallen. Dieser Glanz erreicht nicht den der Sporen, die fehlende Resistenz gegen Erhitzen auf 80° läßt auch leicht feststellen, daß Sporenbildung in der Kultur noch nicht eingetreten ist.

Der Eine von uns (Dietrich) fand nun vor längerer Zeit gelegentlich andersartiger Untersuchungen, daß diese Körnchen sich durch eine einfache Reaktion leicht und deutlich erkennen lassen, eine Reaktion, die bis zu einem gewissen Grade charakteristisch zu sein schien und geeignet erschien, über die Natur der Körnchen Aufschluß zu geben und als Wegweiser für weitere mikrochemische Untersuchungen zu dienen.

In seiner Arbeit über „Das Sauerstoffbedürfnis des Organismus" giebt Ehrlich (7) bereits an, wie aus einer Mischung von Dimethylparaphenylendiamin und α-Naphthol in schwach alkalischer Lösung bei

Gegenwart von aktivem Sauerstoff ein Kondensations- und Oxydationsprodukt entsteht, das Naphtholblau. Dieses ist in Wasser unlöslich und lagert sich im Körper bezw. in einer Zelle an den Stellen ab, wo es sich vermöge der Anwesenheit aktiven Sauerstoffes bildet. Bei bloßem Kontakt mit der Luft tritt eine Blaubildung erst ganz allmählich und (stets frisch bereitete Lösungen und schwach alkalische Reaktion vorausgesetzt) mit nur geringer Intensität ein.

Fertigt man einen Hängetropfen einer Milzbrandbacillenkultur an, vorteilhaft mit Auflegen eines Hollundermarkblättchens nach Arnold (vergl. 3), fügt zuerst ein Tröpfchen einer ca. 1-proz. Lösung von Dimethylparaphenylendiamin und dann einer Lösung von α-Naphthol (frisch umkrystallisiert) in 1-proz. Sodalösung (es löst sich nur wenig und allmählich) hinzu und beobachtet über ausgehöhltem Objektträger, so beginnt meist nach kaum 1 Minute eine Blaufärbung der erwähnten Bakteriengranula aufzutreten, die allmählich bis zu intensivem Dunkelblau zunimmt, während der übrige Bacillenleib völlig ungefärbt bleibt, sich auch außerhalb der Bacillen keinerlei Bildung von Farbstoffniederschlägen einstellt. Die Reaktion tritt nicht ein, wenn man das mit dem Tropfen beschickte Deckgläschen direkt auf einen gewöhnlichen Objektträger legt, also den Kontakt mit der Luft ausschließt. Die Rolle der Körnchen besteht demnach nicht darin, daß sie Sauerstoff abgeben, daß sie einfach oxydierend wirken, sondern sie müssen den molekularen Sauerstoff der Luft aktivieren, sie müssen als Sauerstoffüberträger funktionieren.

Sporen und Sporenvorstufen lassen sich leicht von den Granulis unterscheiden, da sie die Naphtholblaureaktion nicht geben. Außerdem tritt sie ja in Bouillonkulturen auf, in denen eine Bildung von Sporen nicht erfolgt.

Die Reaktion ist in Schrägagarkulturen, die direkt aus der Maus gezüchtet wurden, schon nach 8-stündigem Wachstum bei 37° darstellbar; es finden sich ein oder mehrere kleinste Pünktchen, die ungefärbt nur schwer erkennbar sind, aber in der Blaufärbung sich deutlich inmitten der Stäbchen und Fäden hervorheben. Bei weiterem Wachstum (bis 24 Stunden) werden die Körnchen größer, es finden sich in einem Stäbchen eines Fadens ein größeres centrales oder 2 mehr an den Enden stehende Körnchen, doch auch 3 oder mehrere kleine Granula. Bei geeigneter Kulturmethode, am besten auf Kartoffel, sieht man dann in 24—48 Stunden neben den Granula die ungefärbten Sporen oder Sporenvorstufen. Noch ältere, bis mehrere Wochen alte Agarkulturen bieten weniger zahlreiche, doch sehr große sich bläuende Körner, die in den involvierten, oft bizarr gestalteten Bacillenleibern liegen.

Verschieden ist das Verhalten der Körnchen, wie bereits oben angedeutet wurde, in verschiedenen Kulturmedien. Auf Agar und Kartoffel tritt die Bildung anscheinend am raschesten ein, in Bouillon sind nach 15 Stunden nur spärliche, nach 48 Stunden jedoch ebenfalls zahlreiche Naphtholblaureaktion gebende Granula vorhanden. Auf erstarrtem Blutserum gezüchtete junge Milzbrandkulturen zeigten reichliche Körnchenbildnng, doch auffallend war es, daß weiterhin (48 Stunden) bei eintretender Verflüssigung des Serums die Bacillen homogen ohne alle Granula erschienen, auch bei noch längerem Wachstum traten sie nicht mehr auf. Ebenso unterblieb die Bildung von Körnern, welche die charakteristische Reaktion gaben, bei anaërober Züchtung auf

Schrägagar im Buchner'schen Röhrchen; die Bakterien erschienen homogen, auch trat keine Sporenbildung ein.

Es erhob sich zunächst die Frage, ob die Aktivierung des Sauerstoffes in den Granulis eine Lebensthätigkeit der Bacillen darstellt, ob wir in ihnen vielleicht Orte einer bestimmten Funktion des Protoplasmas zu erblicken haben. Es blieben jedoch selbst nach 1-stündigem Erhitzen auf 100° die Körnchen in ihrer charakteristischen Form und Reaktionsfähigkeit unverändert, während die Bacillen sich als abgetötet erwiesen. Die Substanz der Körnchen muß also aus einem hitzebeständigen Stoffe bestehen, der seine Fähigkeit, Sauerstoff zu aktivieren, festhält. Auch mit der Virulenz der Bacillen hängt das mehr oder weniger zahlreiche Auftreten der Körnchen nicht zusammen, denn in abgeschwächten Kulturen (Vacc. Past. I) waren sie ebenso zu erkennen wie in frisch dem rasch gestorbenen Tiere entnommenen Stämmen. Dieses Vorhandensein der Granula in Vaccin I bestärkt auch die bereits besprochene Unabhängigkeit ihres Auftretens von der Sporulation.

Weiterhin galt es zu untersuchen, ob bei anderen Bakterienarten Körnchen mit gleicher Reaktion auftraten. Sie fanden sich auch bei Diphtheriebacillen, bei Bac. typhi und coli, bei Vibrio cholerae, und zwar lagen sie hier meist als kleine Körner an beiden oder einem Pole, oder auch hier und da in der Mitte des Leibes, so daß auch hier manchmal 3 Körnchen auftraten. Bac. pyocyaneus und Megatherium bilden ebenfalls Granula mit Naphtholblaureaktion. Bei Tuberkelbacillen tritt in jungen, kaum sichtbar angegangenen Kulturen (5-tägigen eines sehr rasch wachsenden Stammes) die Naphtholblaureaktion an den Polen der Bacillen ebenfalls rasch und deutlich ein, während sie in älteren Kulturen ausbleibt, obwohl ungefärbte polständige Granula hier und da undeutlich zu sehen sind. Wir vermißten dagegen Körnchen, welche unsere Reaktion gaben, bei den anaëroben Arten des malignen Oedems und Rauschbrandes (wie ja auch bei anaërob gezüchtetem Milzbrand), ferner bei Proteus vulgaris, auch bei aërobem Wachstum, und Bac. prodigiosus.

Weitere Arten haben wir vorerst nicht untersucht, sondern die Frage verfolgt, mit welchen von den Autoren färberisch dargestellten Granulis die unseren übereinstimmten. Unsere Körnchen färbten sich in Milzbrandbacillen mittels frischer, wässeriger Hämatoxylinlösung schwach violett, ebenso in alkalischer Coeruleïnlösung.

Nach Nakanishi's Methode (8) traten die Granula als dunkelblaue Körner schön hervor, wenn man den Objektträger nur dünn bestrich und beobachtete, solange die Bacillen noch nicht zu viel Farbstoff an sich gerissen hatten.

Die Möller'sche Methode der Sporenfärbung (1—2 Minuten Chromsäurebeizung) ließ die Sporen und deren Vorstufen, die also keine Naphtholblaureaktion gaben, stets rot erscheinen, unsere Körnchen dagegen verhielten sich wechselnd, vielfach waren sie mit der blauen Gegenfärbung tingiert, doch hielten sie auch oft das Karbolfuchsin fest, wie die sogenannten Bunge'schen Körnchen. Besonders zeigten letzteres Verhalten die durch Verdauung und andere chemische Einflüsse macerierten Milzbrandbacillen. Bei anderen Bakterienarten (Bac. diphtheriae, coli etc.) waren die Granula niemals säurefest.

Die metachromatischen Körnchen Krompecher's (2) konnten wir bei unseren Milzbrandbacillen, ebenso bei den übrigen untersuchten Bakterien nicht zur Darstellung bringen, selbst bei An-

wendung eines sehr alten Karbolmethylenblaus, auch nicht, als wir Unna'sches polychromes Methylenblau zur Bereitung des Karbolmethylenblaus benutzten.

Am besten waren die Granula mit der Babes-Ernst'schen Methode darstellbar (wir benutzten stets Methylenblau-Bismarckbraun). Schön und überzeugend war die Uebereinstimmung unserer Naphtholblau-Granula mit den Babes-Ernst'schen Polkörnern bei Diphtheriebacillen, auch bei Cholera-, Typhus- und Coli-Bacillen war sie erkennbar. Schwer gelingt dagegen die Babes-Ernst'sche Färbung, wie ja bereits Ernst (9) in seiner ersten Mitteilung angiebt, bei Milzbrandbacillen; wenn sie aber glückte, so nahmen unsere Granula die blaue Farbe an im Gegensatze zu dem braunen übrigen Bacillenleibe.

Wir treten nun der schon von vielen Autoren bereits geäußerten Ansicht bei, daß den färberischen Unterschieden der Bakteriengranula keine große Bedeutung beigelegt werden darf, da die Darstellung aller Differentialfärbungen einer gewissen Willkür des Untersuchers unterworfen ist. Es können sich demnach in einer Kultur und vielleicht sogar nebeneinander Babes-Ernst'sche, Bunge'sche und Krompecher'sche Körnchen unterscheiden lassen, während sie doch in ihrer physiologischen Bedeutung und chemischen Zusammensetzung identisch sein können. Das wechselnde Verhalten der unsere Naphtholblaureaktion einheitlich gebenden Körnchen gegenüber der Möller'schen und Babes-Ernst'schen Färbung unterstützt diese Ansicht. Daß aber die Naphtholblaukörnchen als einheitliche Gebilde anzusehen sind, zeigt ihr stets gleichmäßiges Verhalten gegenüber allen angewandten chemischen Agentien.

Es bleibt uns nur noch übrig, die chemische Natur der beschriebenen Granula zu untersuchen. Von den zahlreichen angestellten Reaktionen, die zunächst fast ausschließlich mit Milzbrandbacillen angestellt wurden, führen wir nur die wichtigsten an; wir wollen noch vorher bemerken, daß die Einwirkung der Reagentien auf die Körnchen geprüft wurde, indem nach möglichster Entfernung des Reagens (durch Auswaschen, Neutralisieren u. s. w.) der Ausfall der Naphtholblaureaktion mit der der Ausgangskultur verglichen wurde. Außerdem ist zu erwähnen, daß teils frische, von Agarflächen abgehobene Bacillen zur Prüfung benutzt wurden, teils solche, die durch Kochen, Säure, Eau de Javelle oder durch Verdauungsfermente vorbehandelt waren, um sie den Agentien zugänglicher zu machen.

Kochen ließ, wie bereits erwähnt, die Granula vollständig unverändert, ebenso langes Aufbewahren der Bacillen in destilliertem Wasser.

Eau de Javelle bringt die Bacillenleiber und Sporen mit Sporenvorstufen rasch zur Quellung, nach längerer Einwirkung zur Auflösung, unsere Granula lassen sich jedoch nach mehr als 24 Stunden noch unverändert in den Resten der Bacillenleiber nachweisen.

Auch Kalilauge (5-proz.), Liqu. Ammon. caust., starke (10-proz.) Sodalösung lassen die Granula unverändert.

Das gleiche Verhalten bieten 10-proz. Mononatriumphosphat, verdünnte Essigsäure, Eisessig. Selbst starke Mineralsäuren, Schwefelsäure, Salpetersäure, Salzsäure lösen die Körnchen nicht, diese leisten vielmehr der allmählichen Zerstörung länger Widerstand als der übrige Bacillenleib.

Auch Verdauungsfermente vermögen die Körnchen nicht zu

vernichten, selbst wenn der ganze Bacillenleib aufgelöst ist, höchstens vielleicht noch die etwas widerstandsfähigere Membran übrig geblieben ist; es wurden geprüft Pepsinsalzsäure, Trypsin und Papayotin in kontrolliert wirksamen Lösungen. Mundspeichel zeigte ebensowenig eine Einwirkung.

Die mikrochemische Wirkung vieler Reagentien muß man mit Vorsicht beurteilen, da sie im Hängetropfen teils durch Ausgleich der optischen Differenz die Körnchen unsichtbar machen, teils durch Gerinnungsvorgänge oder sonstige Beeinflussung des Bacillenleibes die Granula verdecken. Hier schützt die Kontrolle der Naphtholblaureaktion nach Entfernen das Reagens vor Irrtum.

So verschwinden die Körnchen scheinbar in Alkohol, Aether-Alkohol, Chloroform und Benzin, aber selbst nach tagelangem Extrahieren durch Aether-Alkohol bei 57°, wenn die öfters erneute Flüssigkeit ohne Rückstand verdampft, sind die Körnchen in den Bacillen unverändert in Zahl und Form zu erkennen; es war gleichgiltig, ob hierbei die Bakterien vor der Extraktion gekocht oder mit Säuren oder Verdauungsfermenten behandelt waren.

Als besonders wichtiges Reagens wurde das Chloralhydrat von A. Meyer (10) in die Bakteriologie eingeführt. In einer kleinen Anmerkung der Grimme'schen Arbeit ist ja auf die Täuschung hingewiesen, welche dieser Stoff in konzentrierter Lösung (5 g : 2,0 Wasser) vermöge seiner starken Lichtbrechung hervorrufen kann; jedenfalls hätte aber die Empfehlung des Chloralhydrates zur mikrochemischen Erkennung von Fett durch Erwähnung dieser Eigenschaft in A. Meyer's erster diesbezüglicher Mitteilung eingeschränkt werden müssen. In Chloralhydrat werden Milzbrandbacillen sogleich stark und gleichmäßig aufgehellt, entfernt man aber dasselbe, was nur durch langes Centrifugieren und Auswaschen gelingt, so sieht man unsere Körnchen unvermindert und in unveränderter Reaktionsfähigkeit in den Bacillen liegen.

Es bleiben noch einige Reaktionen anzuführen. In Millon's Reagens verschwinden die Granula optisch, färben sich nicht und sind nach Auswaschen unverändert. Biuretreaktion geben sie nicht.

Jodjodkalium färbt sie dunkelgelb bis braungelb, durch Schwefelsäure wird die Farbe nicht verändert, bei Erhitzen verschwindet sie.

Osmiumsäure schwärzt die Körnchen weder in Lösung noch in Dampfform.

Sudan III in 50-proz. Alkohol verleiht den Granulis eine ganz schwach Orange- bis Rosa-Färbung, welche nur bei guter Beleuchtung und tiefer Einstellung gut erkennbar ist. Grimme beschreibt ein ähnliches Verhalten von Körnchen in Timotheebacillen, was auch wir bestätigen konnten. Der Schluß jedoch, daß es sich dann noch um Fett handele, halten wir nach unseren Beobachtungen für unberechtigt. Fetttröpfchen, welcher Herkunft sie auch sein mochten, nahmen mit Sudan III stets die lebhafte rote grelle Farbe an, etwa die des geräucherten Lachses, während unsere Granula in Milzbrandbacillen, ebenso die in Timotheebacillen höchstens die zarte Farbe des frischen Salmes erreichten. Die Sudanreaktion trat auch ein, nachdem die Bacillen in Aether-Alkohol oder Chloroform erschöpfend extrahiert waren.

Was können wir aus diesen Reaktionen über die Natur der fraglichen Körnchen schließen?

Daß sie mit Sporen bezw. Sporenvorstufen in keinem unmittelbaren Zusammenhange stehen, geht ohne weiteres aus dem verschiedenen Ver-

halten der letzteren sowohl gegen die Naphtholblaureaktion wie gegen die übrigen Reagentien, z. B. Eau de Javelle, hervor.

Zu den Reservestoffen gewöhnlicher Art können wir sie auch nicht rechnen. Sie bestehen weder aus Stärke oder stärkeähnlicher Substanz, mit Glykogen stimmt das ganze chemische Verhalten nicht, auch Fett können sie nicht sein. Grimme erwähnt in seiner oft citierten Abhandlung, daß Milzbrandbacillen Fett als Reservestoff ablagern; wahrscheinlich hat er die gleichen Körnchen wie wir im Auge, doch schließt er ihre Fettnatur aus dem Ausfall der Chloralhydrat- und Sudanreaktion, die, wie wir sahen, leicht täuschen kann.

Grimme beschreibt ferner gewisse Gebilde im Bakterienprotoplasma als Volutanskugeln; abgesehen davon, daß mit diesem Namen wenig über die Natur der betreffenden Granula gesagt ist, stimmt deren Verhalten gegen Kochen und chemische Agentien mit den unseren nicht überein.

So könnten die Körnchen, wie bereits Marx und Woithe (1) für die Babes-Ernst'schen Körnchen annahmen, Kondensationsprodukte des Protoplasmas sein. Abgesehen davon, daß mit dieser Bezeichnung wenig gewonnen wäre und wir es vermeiden möchten, der Hypothese, welche Marx und Woithe daran anknüpfen, über ihre Bedeutung für die Erhaltung der Art etc., irgendwie beizutreten, ist doch die Zusammensetzung der Körnchen aus Eiweißkörpern gewöhnlicher Art fraglich, da sie Verdauungsfermenten so energisch Widerstand leisten, länger als der übrige Bacillenleib. Man könnte an einen zu den Nukleïnen gehörenden Körper denken, aber damit stimmt wieder nicht ihre Unlöslichkeit in Mononatriumphosphat, in verdünnten Alkalien und Essigsäure.

Immerhin besteht doch die Möglichkeit, daß unsere Körnchen zu den Nukleïnen und verwandten Körpern zu stellen sein dürften; die Handbücher der physiologischen Chemie zeigen uns, wie mannigfaltig und verschiedenartig die zu dieser Klasse gehörenden Stoffe sind und wie weit manche von den allgemeinen Charakteren der Gruppe abweichen.

Weiterer Aufschluß ist nur zu erwarten, wenn es gelingt, in großen Mengen von Kulturen die Körnchen durch geeignete Methoden zu isolieren und die fragliche Substanz analytisch zu untersuchen.

Wir müssen daher auch davon Abstand nehmen, über die physiologische Bedeutung der Körnchen mehr als Vermutungen zu äußern. Es ist ja möglich, daß die Naphtholblaureaktion eine mehr nebensächliche und zufällige Eigenschaft ist, aber manches deutet darauf hin, daß die Körnchen auch für den lebenden und wachsenden Bacillus die Rolle eines Sauerstoffüberträgers besitzen[1]).

In einer ausführlicheren Mitteilung wird hoffentlich hierüber mehr mitgeteilt werden können.

---

1) Eine ähnliche Bedeutung schreiben Plato und Guth (11) gewissen Körnchen in Schimmelpilzen zu, welche imstande sind, reduziertes Neutralrot zu reoxydieren. Unsere Körner vermochten dies nicht, auch eine große Zahl anderer reduzierter Farbstoffe wurde bisher vergeblich daraufhin untersucht. Ebenso wie die Naphtholblausynthese gelingt eine Oxydation von Dimethylparaphenylendiamin und Phenol.

Litteratur.

1) Marx und Woithe, Morphologische Untersuchungen zur Biologie der Bakterien. (Centralbl. f. Bakt. etc. Abt. I. Bd. XXVIII. 1900. p. 1.)
2) Krompecher, Untersuchungen über das Vorkommen metachromatischer Körnchen etc. (Centralbl. f. Bakt. etc. Abt. I. Bd. XXX. 1901. p. 385.)
3) Ernst, Ueber den Bau der Bakterien. (Centralbl. f. Bakt. etc. Abt. II. Bd. VIII. 1902. No. 1.)
4) Fischer, A., Cyanophyceen und Bakterien. Leipzig 1897.
5) Meyer, Arthur, Ueber Geißeln, Reservestoffe, Kerne und Sporenbildung der Bakterien. (Flora. 1899. p. 428.)
6) Grimme, Arnold, Die wichtigsten Methoden der Bakterienfärbung. (Centralbl. f. Bakt. etc. Abt. I. Orig. Bd. XXXII. 1902. No. 1 ff.)
7) Ehrlich, P., Das Sauerstoffbedürfnis des Organismus. Berlin 1884.
8) Nakanishi, Ueber den Bau der Bakterien. (Centralbl. f. Bakt. etc. Abt. I. Bd. XXX. 1901. p. 97 ff.)
9) Ernst, P., Ueber den Bacillus Xerosis und seine Sporenbildung. (Zeitschr. f. Hyg. Bd. IV. 1888. p. 25.)
10) Meyer, Arthur, Ueber Unterscheidung von Fett und Sporen in Bakterien. (Centralbl. f. Bakt. etc. Abt. I. Bd. XXX. 1901.)
11) Plato und Guth, Zeitschr. f. Hyg. Bd. XXXVIII. 1901. p. 319.

Erwiderung auf die Bemerkungen Shiga's über meine Amöbenbefunde bei der in Ostpreussen herrschenden Ruhr.

Von Prof. **H. Jaeger** in Königsberg.

Shiga teilt mit, daß die von ihm in 5 Fällen japanischer Ruhr gefundenen Amöben keine Dysenterieamöben gewesen seien, sondern zur nicht pathogenen *Amoeba coli* gehört haben. Er zieht daraus den Schluß, die von mir in Ostpreußen gefundenen müßten gleichfalls zur *Amoeba coli* gerechnet werden. Er begründet diesen Schluß damit, daß er die Unterschiede betont, welche er zwischen den von ihm in Japan vereinzelt bei Bacillendysenterie gefundenen und den von Amöbendysenterie stammenden Amöben wahrgenommen hat. Shiga hat einerseits Recht, wenn er als charakteristisch für die Amöben der ostasiatischen Ruhr, wie wir sie ja auch in Deutschland bei zurückgekehrten Chinakriegern noch da und dort zu sehen bekommen — ich selbst habe dieselben sowohl in Berlin als in Rastenburg bei Rekonvalescenten von in China erworbener Ruhr gesehen und gezeichnet — die bedeutendere Größe, die schärfere Scheidung des Ekto- vom Endoplasma (oder richtiger die gröbere Granulierung des letzteren) namentlich aber die erheblich raschere Beweglichkeit gegenüber den von mir beschriebenen Amöben betont. Er bleibt uns aber andererseits jede Begründung schuldig, warum er die Amöben von China oder den Philippinen für identisch mit der egyptischen, der *Amoeba Lösch*, zu erklären, sich für berechtigt hält. Lösch selbst bezeichnet die Bewegungen der Amöben als langsame; er beschreibt dieselben, wie folgt: „An einer Stelle der Oberfläche erhebt sich ein glasheller Höcker, der sich weiter erstreckt und in den die körnige Substanz nachwächst . . . . Die Ortsveränderung ist eine langsame. Innerhalb einer Minute legen sie eine Strecke zurück, die der Länge des Körpers entspricht." — Die Größe der Amöben gibt Lösch als zwischen 15 und 35 μ schwan-

kend an. Diese Größe haben auch die von mir beobachteten Amöben, wie man sich aus meinen Abbildungen der lebenden Organismen durch Vergleichung mit den roten Blutkörperchen überzeugen kann. Die Amöben der Chinaruhr sind aber, wie ich mich selbst überzeugt habe, erheblich größer, und was Lösch's oben wiedergegebene Beschreibung der Bewegungen betrifft, so stimmt dieselbe vollkommen mit der meinigen, aber gar nicht mit derjenigen Shiga's überein. Mithin sind die Amöben der ostasiatischen Dysenterie nicht identisch mit denjenigen der egyptischen Dysenterie; vielmehr steht unsere einheimische Dysenterieamöbe der egyptischen viel näher als diese der ostasiatischen. Auch Kruse und Pasquale schildern die Form, Größe und Bewegungserscheinungen bei den Amöben der egyptischen Dysenterie als vollkommen identisch mit denjenigen der nicht pathogenen *Amoeba coli*. Was aber den wesentlichen Unterschied macht zwischen der egyptischen, russischen, deutschen etc. Amöbendysenterie einerseits und der nicht pathogenen *Amoeba coli*, oder richtiger *Amoeba intestini vulgaris* (Quincke) andererseits, das ist in erster Linie ihr strenges Gebundensein an den Ruhrprozeß: sie kommt und verschwindet mit diesem. Der weitere Unterschied liegt in der spezifischen Pathogenität der Amöben, wie sie sich in dem scharenweisen tiefen Eindringen in die Submucosa des menschlichen Darmes bis zur Muscularis und in der Erzeugung von dysenterischem Katarrh und Geschwüren unter Vermehrung der Amöben bei Katzen kund giebt. Das haben schon Kruse und Pasquale und später unter Vergleichung mit bei uns beobachteten Fällen noch präziser Quincke und Roos ausgesprochen. Meine Schnittpräparate zeigen, dass auch unsere einheimische Amöbe der ostpreußischen Ruhr ebenso in den Darm eindringt wie die egyptische, so daß man genau dieselben Bilder erhält, wie sie Kruse und Pasquale (Tafel III, Fig. 4) geben.

Wenn Shiga „über die rundlichen Gebilde, die in Schnittpräparaten der Darmwand als Amöben bezeichnet werden, sich nicht bestimmt äußern kann", so ist eine Aeußerung von seiner Seite auch kein Bedürfnis, denn diese Frage ist bereits entschieden. Ich bin heute in der Lage, den Bestätigungen, daß diese Gebilde in meinen Präparaten in der That Amöben sind, wie ich sie schon von unseren Königsberger Zoologen, den Herren Professor M. Braun und Privatdocent Lühe, besitze, noch die folgenden beizufügen: Herr Dr. Schaudinn, der mich um Präparate von meinen Fällen ersucht hatte, schreibt mir am 7. Sept. 1902 Folgendes: „Den mir von Ihnen übersandten Schnitt eines Darmstückes von einem Ruhrkranken sowie den Faecesausstrich habe ich nach meinen Färbemethoden noch einmal gefärbt und mit meinen Präparaten von egyptischer Dysenterie verglichen. Das Resultat dieser Untersuchung ist, daß ich die von Ihnen in Ostpreußen gefundenen Parasiten des ruhrkranken Darms für identisch halte mit den echten tropischen, speziell den egyptischen Ruhramöben. Ferner wird es Sie vielleicht interessieren, daß auch der bedeutendste Kenner der egyptischen Dysenterie, Herr Geheimrat Koch, der ja die Ruhramöben in Egypten selbst studiert hat, ganz meine Ansicht teilt. Bei einem Besuch bei Herrn Geheimrat Koch zeigte ich ihm Ihr Schnittpräparat und einen Ausstrich von mir; sofort erklärte zu meiner Freude dieser gewiegte Mikroskopiker die beiden Amöbensorten für identisch." — Wir können also, wenn solche Autoren gesprochen haben, über die Zweifel Shiga's zur Tagesordnung übergehen.

Damit erledigt sich auch ein Einwand von anderer Seite: In den „Beobachtungen und Untersuchungen über die Ruhr“[1]) schreibt Jürgens (p. 41): . . . „ganz besonders muß das schwammige oder wabenförmige Aussehen, worin auch neuerdings wieder Jaeger ein Charakteristicum für Amöben erblickte, als Kunstprodukt bezeichnet werden und kann unter keinen Umständen als bezeichnend für Amöben verwertet werden. Denn solche Zellbilder findet man auch im völlig gesunden Darm.“ — Ich habe in keiner meiner Publikationen etwas von schwammiger oder wabenartiger Struktur erwähnt, noch weniger eine solche als Charakteristikum für Amöben bezeichnet, und es dürfte nunmehr feststehen, daß ich keine Kunstprodukte für Amöben angesehen habe. — In den Schnittpräparaten von der Döberitzer Epidemie, die mir Jürgens im letzten Herbst gezeigt hat, konnte auch ich keine Amöben finden und ist es mir daher gleichfalls wahrscheinlich, daß die Döberitzer Epidemie mit Amöbendysenterie nichts zu thun hat.

Ich wiederhole also: Die in Ostpreußen und Rußland bei Dysenterie vorkommende *Amoeba Lösch* ist identisch oder doch sehr nahe stehend der Amöbe der egyptischen Ruhr. Es kommt ihr dieselbe ätiologische Bedeutung zu wie dieser. Sie ist aber verschieden von der Amöbe der ostasiatischen Ruhr.

Ich komme nun zum zweiten Theil der Ausführungen von Shiga. Glaubt Shiga wirklich, daß mir bei einigen 30 schweren Ruhrfällen in 2 Jahren (darunter 2 zur Sektion gekommene Fälle) sein Bacillus jedesmal entgangen sei? Ein Bacillus, der wie Bact. coli oder der Typhusbacillus ohne weiteres auf Gelatine wächst? Ich würde Herrn Shiga es gewiß gönnen, wenn sein Bacillus auch in Ostpreußen gefunden würde; zur Zeit fehlt er noch und bei unseren zwei Militärepidemieen ist er nicht vorhanden gewesen.

Zur Kenntnis der sexuellen Amphitypie bei Dicrocoeliinen.

[Aus dem zoologischen Museum zu Königsberg i. Pr.]

Von **Johanne Hollack.**

Im Laufe der letzten Jahre ist von verschiedenen Seiten auf eine Variabilität der Genitalorgane bei Trematoden hingewiesen worden; namentlich ist bei verschiedenen Distomenarten ein Vertauschen von links und rechts beobachtet und von Einigen, z. B. Jacoby (3), als Situs inversus, von Anderen, nach Kowalewski (4, 5), als sexuelle Amphitypie bezeichnet worden.

Stiles und Hassall (11) haben 1894 zuerst auf diese Erscheinung hingewiesen und Kowalewski (4) lenkte 1898 die Aufmerksamkeit dadurch auf die in Rede stehende Abnormität, daß er die sexuelle Amphitypie als charakteristisches Merkmal für die *Opisthorchis*-Arten bezeichnete. Braun (1) konstatierte kurze Zeit darauf, daß die Verlagerung der Geschlechtsorgane auch bei *Athesmia heterolecithodes* (M. Brn.) vorkommt. Jacoby (3) fand sie außer bei der letztgenannten

1) Veröffentlichungen aus dem Gebiete des Militärsanitätswesens. Heft 20. Berlin (A. Hirschwald) 1902.

Art noch bei *Dicrocoelium lanceatum* Stiles et Hassall (= *Distomum lanceolatum* Mehlis). Infolge dieser Untersuchungen kann sexuelle Amphitypie jetzt nicht mehr als Charakteristikum der Opisthorchiinen angesehen werden, sondern erstreckt sich auch auf die Dicrocoeliinen. Lühe (8) spricht die Vermutung aus, daß sicher noch bei anderen Distomenarten Situs inversus zu finden sei. Looss (6) erklärt, daß nach seinen Erfahrungen die von Kowalewski (4, 5) als sexuelle Amphitypie bezeichnete Erscheinung „bei sehr vielen Distomenarten mehr oder minder häufig“ vorkommt, ohne jedoch nähere Angaben darüber zu machen. Weski (13) hat dann *Opisthorchis lancea* (Dies.) auf die Häufigkeit der Amphitypie untersucht, da ihm ein sehr reichhaltiges Material zur Verfügung stand. v. Ofenheim (10), Looss (7) und Stossich (12) stellen das Vorkommen von Situs inversus noch bei drei weiteren, weder zu den Dicrocoeliinen noch zu den Opisthorchiinen zu zählenden Arten fest.

Folgende Tabelle giebt die bis jetzt bekannten Fälle an.

Species	Beobachter	Zahl der untersuchten Exemplare	Darunt. Fälle von Situs inversus
Metorchis complexus (St. et H.)	Stiles et Hassall [1])	10	4mal
„ *poturzycensis* (Kow.)	Kowalewski	?	1 „
„ *crassiusculus* (Rud.)	Jacoby [2])	84	7 „
„ *albidus* (M. Brn.)	Jacoby [2])	68	16 „
„ *truncatus* (Rud.)	Jacoby [2])	50	6 „
Opisthorchis felineus (Riv.)	Jacoby [2])	100	8 „
„ *lancea* (Dies.)	Weski	400	2 „
„ *longissimus* var. *corvinus* (St. et H.)	Stiles et Hassall	4	2 „
Dicrocoelium lanceatum (Stiles et Hass.)	Jacoby	15	5 „
Athesmia heterolecithodes (M. Brn.)	Jacoby	11	4 „
Anaporrhutum albidum v. Ofenh.	v. Ofenheim	„des öfteren beobachtet“	
Anisocoelium capitelletatum (Rud.)	Looss	ohne Angabe der Zahl	
Helicometra mutabilis (Stoss.)	Stossich	„ „ „ „	

Da seiner Zeit Jacoby (3) nur wenig Exemplare von *Dicrocoelium lanceatum* zur Verfügung standen, und da das Königsberger zoologische Museum in diesem Frühjahre durch Dr. Fischoeder eine erhebliche Anzahl dieser Species erhalten hat, so war jetzt die Gelegenheit gegeben, die Häufigkeit des Situs inversus bei dieser Art genauer zu ermitteln.

Prof. Braun übergab mir im Juli das vorhandene Material zur Untersuchung. Sehr merkwürdig ist das Resultat, denn von 666 Exemplaren habe ich 333 Tiere gefunden, bei denen rechts von der Uterusschlinge der vordere, links davon der hintere Hoden und der Keimstock lagen, während die andere Hälfte der untersuchten Individuen das umgekehrte Verhältnis, also: links den vorderen, rechts den hinteren Hoden und den Keimstock aufweist.

Bei allen bisher bekannten Fällen konnte man, soweit bestimmte Zahlen in Betracht kommen, immer von einer Majorität und einer Minorität, einem normalen und einem anormalen Verhalten sprechen. Hiervon kann bei *Dicrocoelium lanceatum* St. et H. nicht die Rede sein.

---

1) Stiles und Hassall führen noch *Distomum conjunctum* Cobb. an, stützen sich aber hierbei nur auf Abbildungen, die, wenn auch mit demselben Namen bezeichnet, sicher zu verschiedenen Arten gehören.

2) Stiles und Hassall bezw. Kowalewski sind die ersten Beobachter der Amphitypie bei diesen Arten.

Selbst wenn die von Jacoby gezählten Exemplare zu den von mir untersuchten zugerechnet würden, so ist der Unterschied so gering, daß es nicht möglich ist, das eine Lageverhältnis als normal, das andere als Anomalie zu bezeichnen. Daher ist auch in diesem Falle der der pathologischen Anatomie entlehnte Ausdruck Situs inversus wenig zutreffend, sondern die von Kowalewski angewandte Benennung „sexuelle Amphitypie" würde hier besser passen.

Da bis jetzt hauptsächlich Opisthorchiinen und verhältnismäßig wenig Dicrocoeliinen auf das Vorkommen von Situs inversus hin untersucht worden sind, so habe ich auf Dr. Lühe's Veranlassung noch zwei weitere Arten dieser Gruppe und zwar *Distomum mutabile* Molin und *Dicrocoelium concinnum* M. Brn. untersucht.

10 Exemplare von *Distomum mutabile* Molin konnten untersucht werden; bei 6 Tieren lag der Keimstock rechts von dem aufsteigenden Uterusaste, während die anderen 4 Individuen das umgekehrte Verhältnis zeigten.

Zufälligerweise waren diese letztgenannten Tiere die ersten, die ich untersuchte, während Lühe (9) bei seinen früheren Beobachtungen dieser Art gerade das zuerst angeführte Verhalten gesehen hatte. Dieses ist wieder ein Beweis, daß man bei einer geringen Anzahl von Individuen niemals etwas Sicheres insbesondere in Bezug auf sexuelle Amphitypie feststellen kann.

Bei 4 Exemplaren von *Dicrocoelium concinnum* (M. Brn.) lag der Keimstock 3mal rechts und 1mal links.

Königsberg i. Pr., den 27. August 1902.

Litteraturverzeichnis.

1) Braun, M., Ein neues *Distomum* aus *Porphyrio*. (Zool. Anz. Bd. XXII. 1899. No. 577. p. 1—4.)

2) — —, Ein neues *Dicrocoelium* aus der Gallenblase der Zibethkatze. (Centralbl. f. Bakt. etc. Abt. I. Bd. XXX. 1901. No. 18. p. 700—702. 1 Fig.)

3) Jacoby, S., Beiträge zur Kenntnis einiger Distomen. [Inaug.-Diss.] 8°. 30 p. 2 Taf. Königsberg 1899. (Auch im Arch. f. Naturg. Jahrg. 1900. Bd. I. Heft 1. p. 1—31.)

4) Kowalewski, M., Studya helmintologiczne V. Przyczynek do bliższej znajomości kilku przywr. (Rozprawy Wydz. mat. przyr. T. XXXV. w Krakowie 1898. p. 106—164. Tab. I—II.)

5) — —, Etudes helmintologiques V. Contribution à l'étude de quelques Trématodes. (Bull. Acad. Sci. Cracovie. Février 1898. p. 69—77.) (Résumé des Vorigen.)

6) Looss, A., Weitere Beiträge zur Kenntnis der Trematodenfauna Aegyptens, zugleich Versuch einer natürlichen Gliederung des Genus *Distomum* Retzius. (Zool. Jahrb. Abt. f. Syst. Bd. XII. 1899. Heft 5/6. p. 521—784. Taf. 24—32.)

7) — —, Ueber die Fasciolidengenera *Stephanochasmus*, *Acanthochasmus* und einige andere. (Centralbl. f. Bakt. etc. Abt. I. Bd. XXIX. 1901. No. 14. p. 595—661. 14 Fig.)

8) Lühe, M., Zur Kenntnis einiger Distomen. (Zool. Anz. Bd. XXII. 1899. No. 604. p. 524—539.)

9) — —, Ueber einige Distomen aus Schlangen und Eidechsen. (Centralbl. f. Bakt. etc. Abt. I. Bd. XXVIII. 1900. No. 17. p. 555—566.)

10) v. Ofenheim, C., Ueber eine neue Distomidengattung. (Zeitschr. f. Naturwiss. Bd. LXXIII. 1900. p. 145—186. 1 Taf. u. 4 Fig.)

11) Stiles, Ch. W. and Hassall, A., Notes on parasites, 21: A new species (*Distomum complexus*) found in cats etc. (Veterinary Magaz. 1894.)

12) Stossich, M., Sopra una nuova specie delle Allocreadiinae. (Arch. d. Paras. Vol. V. Année 1902. No. 4. p. 578.)

13) Weski, O., Mitteilungen über *Distomum lancea* Dies. (Centralbl. f. Bakt. etc. Abt. I. Bd. XXVII. 1900. No. 16/17. p. 579—583. 1 Abb.)

Ueber Bau und Embryonalentwickelung von Zoogonus mirus Lss.

[Aus dem zoologischen Institut Heidelberg.]

Vorläufige Mitteilung.

Von Dr. **Richard Goldschmidt.**

Mit 6 Figuren.

In Bd. XXIX. dieser Zeitschrift beschrieb Looss[1]) einen interessanten, neuen Trematoden aus dem Enddarme von *Labrus merula*, den er *Zoogonus mirus* nannte und dessen interessanteste Eigentümlichkeit darin besteht, daß sich die Embryonen ohne eine Eischale frei im Uterus entwickeln. Da zu erwarten war, daß hier ein geeignetes Objekt zum Studium der noch nicht genügend aufgeklärten Trematodenentwickelung vorlag, benutzte ich einen Aufenthalt an der Zoologischen Station in Rovigno, um Material von diesem Parasiten zu sammeln, den ich in den untersuchten Exemplaren von *Labrus merula* ziemlich reichlich fand. Da der Abschluß der Untersuchung, zu dem ich vor allem noch lebendes Material benötige, für einige Zeit hinausgeschoben werden muß, möchte ich hier vorläufig über einige interessante Punkte berichten.

Da es Looss nicht gelungen war, den Bau der fraglichen Form näher zu ergründen, so sei zunächst dieser hier erledigt. Inzwischen erschien übrigens, ebenfalls in dieser Zeitschrift, eine Abhandlung von Odhner[2]), der eine mit *Zoogonus mirus* nahe verwandte Form als *Z. rubellus* Olss. beschreibt und für diese, sowie eine weitere Gattung *Zoogonoides* mit *Z. viviparus* Olss. als einziger Form die Subfamilie *Zoogoninae* gründet. Odhner gelang es, für diese Formen den merkwürdigen Bau der weiblichen Geschlechtsorgane aufzuklären; nach seiner, in einigen Punkten zu ergänzenden Beschreibung scheint es mir übrigens, daß *Z. mirus* und *Z. rubellus* ein und dieselbe Form darstellen.

Auf Körperform, Größenverhältnis und Bestachelung des Körpers brauche ich nicht einzugehen. Nach Looss ist für *Z. mirus* charakteristisch, daß der Mundsaugnapf größer ist als der Bauchsaugnapf, während bei *Z. rubellus* nach Odhner das Verhältnis umgekehrt ist. Ich finde die Größe der Saugnäpfe sehr wenig voneinander verschieden, gewöhnlich ist aber der Bauchsaugnapf eine Kleinigkeit größer. Der Darmapparat stellt sich bei meinen Exemplaren etwas anders dar, als er von den beiden Autoren beschrieben wird. Wie Looss richtig angiebt, ist der am Vorderrande kreuzweise eingekerbte Pharynx von dem Mundsaugnapfe durch einen langen Präpharynx geschieden. Es folgt dann ein Oesophagus, der sich in die beiden Darmschenkel gabelt. Die Gabelung findet nach beiden Autoren unter dem Bauchsaugnapfe statt, ich sehe sie aber immer erst eine Strecke weit hinter diesem eintreten (Fig. 1). Vor allem aber finde ich die beiden Darmschenkel niemals so lang, wie es beide Autoren abbilden, sondern immer sehr kurz und

1) Looss, A., Ueber einige Distomen der Labriden des Triester Hafens. (Centralbl. f. Bakt. etc. Abt. I. Bd. XXIX. 1901.)

2) Odhner, Th., Mitteilungen zur Kenntnis der Distomen. (Centralbl. f. Bakt. etc. Abt. I. Orig. Bd. XXXI. 1902.)

plump keulenförmig. Jeder Darmschenkel ist im Verhältnis zum Oesophagus stark erweitert, ja bei starkem Füllungszustande können die beiden Schenkel ganz verschwinden und als ein großer, weiter Sack erscheinen. Besonders bemerkenswert sind aber die histologischen Verhältnisse des Darmkanales. Die Wand des Präpharynx wie des Oesophagus wird von einer inneren Längsmuskulatur ausgekleidet, die aus einzelnen, in regelmäßigen Abständen verlaufenden Bündeln besteht, die an der Gabelungsstelle allmählich auf die beiden Schenkel ausstrahlen.

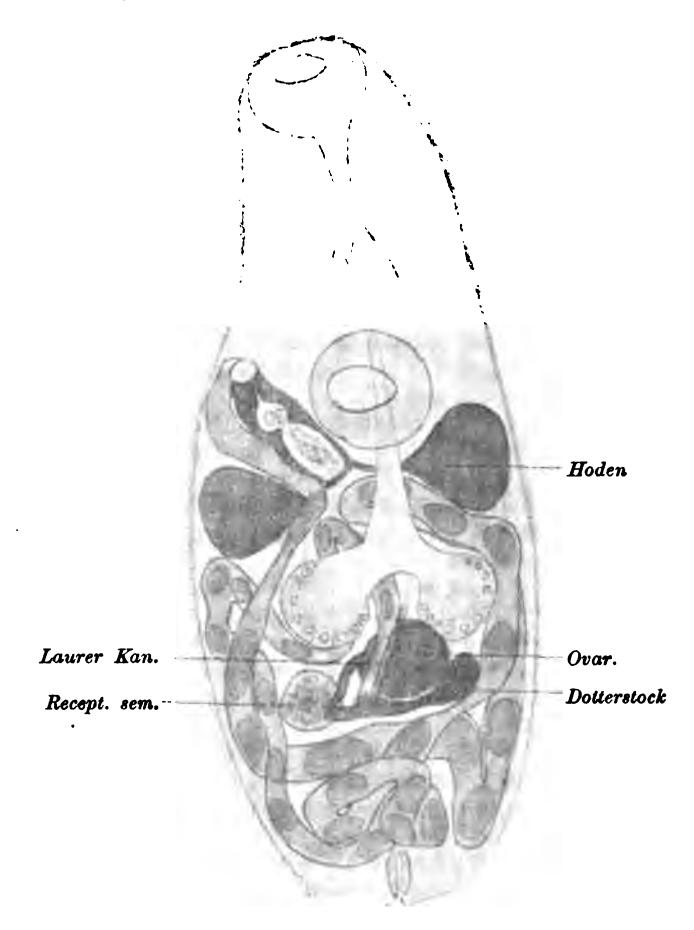


Fig. 1.

Außen findet sich eine ebenso regelmäßige Ringmuskulatur. Dagegen findet sich niemals in der Wand des Präpharynx, des Oesophagus und des Beginnes der Darmschenkel ein einziger Epithelzellkern eingelagert. Das Darmepithel ist vielmehr ausschließlich auf den Grund der Darmschenkel beschränkt (Fig. 1). Hier bildet es annähernd eine Halbkugelschale, die aus regelmäßig nebeneinander stehenden Zellen besteht, die im Centrum der Schale hoch cylindrisch sind, nach ihrem Rande niedriger und mehr kubisch werden. Der Kern der Zelle liegt der Basis genähert, das Plasma ist mit Fetttröpfchen erfüllt, wie aus Osmium-

material zu ersehen ist. Nach dem Lumen des Darmschenkels sendet jede Zelle zahlreiche feine Fäserchen von etwa der gleichen Länge wie die Zelle selbst, die jedenfalls als nicht bewegliche (starre) Cilien morphologisch zu deuten sind und bei der Verdauung wohl wie Pseudopodien wirken; es hängen an ihnen immer feine Fetttröpfchen. Diese vom Epithel ausgekleideten Darmblindsäcke sind durch die Nahrungsmassen, die sie enthalten, bereits mit unbewaffnetem Auge am lebenden Tiere zu sehen, wo sie regelmäßig als 2 schwarze Punkte in die Augen fallen.

Die Anordnung der männlichen Geschlechtsorgane ist bis auf einen Punkt, den Verlauf den Cirrusbeutels, von Looss und Odhner übereinstimmend beschrieben. Nach Looss nämlich biegt sich dieser um den Vorderrand des Bauchsaugnapfes herum und wendet sich dann erst nach hinten, nach Odhner jedoch verläuft er in gerader Richtung schräg nach hinten und innen, um dicht hinter dem Bauchsaugnapfe die Medianlinie zu erreichen. Ich finde die Anordnung immer entsprechend Odhner's Angaben, so daß auch dieses Unterscheidungsmerkmal zwischen den beiden Formen wegfällt. Noch sei auf die schönen Stadien der Spermatogenese, die sich im Hoden finden, hingewiesen.

Der Zusammenhang der weiblichen Geschlechtsorgane, den Looss nicht ergründen konnte, wird von Odhner richtig dargestellt. Von dem zwischen den Darmschenkeln liegenden Ovar, das durch die großen Eizellen mit schönem Dotterkern ausgezeichnet ist, führt der Keimgang im Bogen zu der Vereinigungsstelle mit dem Dottergange; in seinem Verlaufe ist ein großes, kugeliges, dünnwandiges Receptaculum seminis eingeschaltet. Der Keimgang selbst ist dagegen sehr dickwandig und muskulös. Der Dotterstock ist unpaar und liegt als kleines birnförmiges Organ in der Nähe des Keimstockes. (In Fig. 1, die nach einem gepreßten Tiere gezeichnet wurde, ist er ein wenig zur Seite gedrängt.) Die Bezeichnung „Dotterstock“ paßt allerdings für dieses Organ gar nicht und ist nur insofern berechtigt, als es sich um ein dem Dotterstock anderer Trematoden homologes Gebilde handelt. Looss und Odhner haben schon darauf hingewiesen, daß die kleinen polygonalen Zellen mit den chromatinreichen Kernen, die dieses Organ zusammensetzen, keine Spur von Dottersubstanzen enthalten. In der That kommt diesen Zellen, wie wir weiterhin sehen werden, eine ganz andere Funktion zu. Mitotische Zellteilungen, die sonst bei diesem Trematoden sehr schön zu sehen sind, wurden in dem sogenannten Dotterstocke nie beobachtet. An der Vereinigungsstelle von Keim- und Dottergang entspringt ein feiner Kanal, der schräg nach vorn zieht und den Laurerschen Kanal darstellt. Eine Mündung nach außen, wie sie Odhner angiebt und abbildet, konnte ich auch auf den Schnittserien nie auffinden. An jener Vereinigungsstelle beginnt in gewöhnlicher Weise der Uterus — eine Schalendrüse fehlt —, der in zahlreichen Schlingen das Hinterende des Tieres ausfüllt. Die in der gemeinsamen Geschlechtsöffnung ausmündende Vagina ist von dem übrigen Uterus nicht besonders abgesetzt, was nach Looss der Fall sein sollte.

Der Exkretionsapparat zeigt bis auf die Endblase nichts Besonderes; es seien nur die schönen, großen Wimperflammen erwähnt. Die nicht sehr große Exkretionsblase, in die jederseits ein Hauptlängsstamm einmündet, ist nach Looss birnförmig, nach Odhner bei *Z. rubellus* kugelig. Ich finde zwischen beiden Extremen alle Zwischenformen, je

nach dem Füllungszustande. Die Blase, von der uns Fig. 2 einen Längsschnitt zeigt, hat sogar ein spaltförmiges Lumen. Die Wand der Blase wird von wenigen Epithelzellen gebildet, deren abgeplattete Kerne wandständig liegen; das Plasma der Zellen besteht aus senkrecht zur Blasenwand stehenden parallelen Fasern. Außen liegt dem Epithel eine regelmäßige Ringmuskelschicht auf, auf die eine Längsmuskelschicht folgt. Die Cuticula der Körperoberfläche stülpt sich an der Mündung der Blase ein Stück weit in diese ein; an dieser Stelle findet sich ein kräftiger Sphinkter. Das Interessanteste aber ist, daß die äußere Oberfläche der Blase von einer regelmäßigen Lage großer einzelliger Drüsen bedeckt ist, die besonders im Grunde der Blase (Fundus) dicht stehen. Ihre Form und Anordnung ist aus der Fig. 2 zu ersehen.



Fig. 2.

Nach dem Vorausgegangenen scheint es mir ziemlich sicher zu sein, daß *Z. mirus* und *Z. rubellus* ein und dieselbe Form sind, die dann letzteren Namen zu tragen hätte[1]). Denn von den Unterscheidungsmerkmalen, die Odhner angiebt, bleibt nur bestehen, daß bei seinem *Z. rubellus* der Dotterstock relativ größer ist als bei *Z. mirus* und ferner eine Größendifferenz der Miracidien um 0,03 mm, der bei deren Plasticität ja keine Bedeutung zukommt. Es sei allerdings noch bemerkt, daß mir die gelbliche Färbung der Tiere nicht aufgefallen ist, ich hatte darauf aber auch nicht geachtet.

Nunmehr kommen wir zu dem eigentlichen Gegenstand dieser vorläufigen Mitteilung, der Entwickelung von *Z. mirus*. Die fertigen Eizellen gelangen, ohne die Reifungserscheinungen durchgemacht zu haben, in den Keimgang und den Uterus, wobei sich ihnen unterwegs ein Spermatozoon anhängt. Hier am Beginne des Uterus treffen sie nun mit den merkwürdigen Produkten des sogenannten Dotterstockes zusammen. Die bereits beschriebenen Zellen dieses Organes legen sich im Dottergange paarweise aneinander, die Zellleiber verschmelzen miteinander und es entstehen Gebilde mit 2 sehr chromatischen Kernen, wie es Fig. 3 darstellt. Im Uterus angelangt, legt sich ein solches Zellpaar nunmehr einer ovalen Eizelle an einem Pole an und sitzt ihr kappenförmig auf. Und nun beginnt das Plasma der Zellen die Eizelle zu umwachsen, bis diese vollständig eingeschlossen ist. Dies ist der Zustand, in dem man regelmäßig die jungen, noch nicht reifen Eier im Anfange des Uterus findet (Fig. 4). Die Eizelle ist allseitig von einer zarten Membran umschlossen (*Hm*), die sich nur an dem einen Pole verdickt und hier eine kappenartige Plasmamasse vorstellt, der 2 stark färbbare, nahe beieinanderliegende Kerne eingelagert sind (*Fo*). Kurz, das Ei besitzt bereits im unreifen Zustande die für die Di-



Fig. 3.

---

1) Vorausgesetzt ist, daß Looss und mir die gleiche Form vorlag, was aber bei dem gleichen Wirt und der gleichen Lokalität wohl als sicher anzunehmen ist.

stomenentwickelung so charakteristische Hüllmembran. Hier stellt diese sicher kein primäres Ektoderm oder dergl. dar, sondern ist etwas der Eizelle von außen Hinzugegebenes, ein Produkt des Aequivalentes des Dotterstockes, ist nichts anderes als ein Follikel. Daß dies thatsächlich die Funktion der Hüllmembran ist, zeigt sich im Verlaufe der Entwickelung. Es sei nur nebenher darauf hingewiesen, daß dies die Auffassung des Dotterstockes als abgetrennter Teil des Keimstockes sehr befürwortet, da sich die Follikelzellen ja vielfach als den Eizellen gleichwertig herausgestellt haben.

Inzwischen ist in das Ei das Spermatozoon eingedrungen und liegt neben dem Kerne. Der Dotterkern beginnt zu zerfallen (Fig. 4, *dk*) und nunmehr stößt das Ei 2 Richtungskörper in der gewöhnlichen Weise aus. Die Richtungskörper werden immer an dem Eipole gebildet, der durch die beiden Follikelzellkerne ausgezeichnet ist, und liegen hier noch eine Zeit lang innerhalb der Hüllmembran (Fig. 5, Rk_1, Rk_2). Die hier nicht weiter zu schildernden Einzelheiten des Vorganges laufen zum Teil ähnlich ab, wie ich es für *Polystomum integerrimum* [1]) schildern konnte, besonders in Bezug auf das Verhalten des Samenkernes. In Fig. 5 ist ein solches Ei zur Zeit der Vereinigung von Ei- und Samenkern und der Teilung des zukünftigen Furchungscentrosoms wiedergegeben. Die Teilungsebene der ersten Furchungsteilung, die 2 gleichgroße Zellen ergiebt, steht senkrecht zur großen Achse des ellipsoidischen Eies. Während dieser Teilung wandern die Kerne der Hüllmembran nach zwei gegenüberliegenden Punkten im Aequator des Eies. Die weiteren Furchungsvorgänge bieten nicht viel Besonderes dar; die Eiform des Embryo bleibt erhalten und es finden solche Verschiebungen und Umordnungen wie bei *Polystomum* [2]) nicht statt. Auch eine Epibolie läßt sich wie dort weiterhin nicht nachweisen, vielmehr sondert sich einfach eine äußere Lage von kubischen Zellen als Ektoderm von einer inneren, nur aus wenigen Zellen bestehenden, dem Entoderm. In dieser Zeit muß der Embryo einer lebhaften Ernährung und Stoffwechsel unterliegen, denn sämtliche Zellen sind zum Unterschiede von früheren und älteren Stadien stark färbbar, so daß das Studium ganzer Embryonen sehr erschwert ist. Ferner finden sich zwischen den Embryonalzellen zahlreiche sehr stark färbbare Kugeln, die ich als Tropfen von Ernährungsflüssigkeit oder richtiger von Stoffwechselendprodukten auffasse [3]). Da keine Dotterzellen vorhanden sind, so muß die Ernährung direkt aus dem Inhalt des Uterus, und zwar durch Vermittelung des Follikels (Hüllmembran) vor sich gehen. Es sei gleich vorweggenommen,

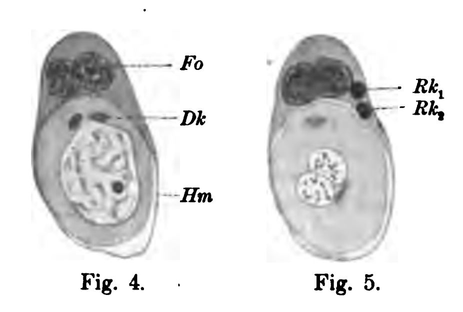


Fig. 4. Fig. 5.

1) Goldschmidt, R., Untersuchungen über Eireifung, Befruchtung und Zellteilung bei *Polystomum integerrimum* Rud. (Zeitschr. wissensch. Zool. Bd. LXXI. 1902.)

2) Goldschmidt, R., Bemerkungen zur Entwickelungsgeschichte des *Polystomum integerrimum* Rud. (Zeitschr. wissensch. Zool. Bd. LXXII. 1902.)

3) Ich habe die gleiche Erscheinung in älteren Stadien von *Polystomum* beobachtet, wo die Ernährung von den sich verflüssigenden Dottersubstanzen ausgeht, die jedenfalls nicht in Form sichtbarer Tropfen aufgenommen werden. Daß es sich um Dotterkugeln handelt, was hier trotz der verschiedenen Färbbarkeit möglich wäre, ist bei *Zoogonus* ja ausgeschlossen.

daß der Embryo, der bis zu dieser Periode des lebhaften Stoffwechsels kaum gewachsen war, von jetzt ab sein Volumen sehr stark vergrößert, was aber wohl hauptsächlich auf Wasseraufnahme zurückzuführen ist.

In den Zellen des Ektoderms tritt nunmehr eine Sonderung ein, indem eine Anzahl von ihnen, es sind genau 9, in die Breite wachsen und so mehr plattenförmig werden. Die Kerne dieser Zellen werden groß, blasig und sehr chromatinarm. Es sind dies die Zellen, die später durch ihren Zusammenschluß die Epidermis der Larve bilden werden. Die zwischen diesen liegenden kleinen Zellen mit sehr chromatinreichen Kernen finden sich hauptsächlich in der Nähe der beiden Pole des Eies. Von dieser Zeit ab findet man im Embryo keine Zellteilungen mehr, die weiteren Vorgänge beruhen vielmehr nur in einer Differenzierung der schon vorhandenen Zellen. Jetzt wandern die gleichen chromatinreichen Zellen aus dem Ektoderm aus, und zwar am vorderen und hinteren Pole als zusammenhängender Strang, den man somit als Ektodermeinstülpung auffassen kann, dazwischen diffus. Letztere sind daran kenntlich, daß die Kerne bald spindelförmig oder unregelmäßig polygonal werden und sich homogen dunkel färben; wir müssen sie als Mesenchym ansprechen. Die großen platten Epidermiszellen schließen sich immer mehr zusammen und nur an einer Stelle bleiben einige wenige (3) kleinere Zellen noch zwischen ihnen liegen. Von den 9 Zellen unterscheidet sich bereits eine, an einem Pole liegende durch stärker färbbares Plasma und durch nicht platte, sondern hoch zapfenförmige Gestalt. Sie heiße die Rüsselzelle, die durch ihre Lage das Vorderende des Embryo kennzeichnet. Da die 3 noch innerhalb der Epidermis liegenden kleinen Zellen die Dorsalseite angeben, so sind jetzt die Richtungen des Embryo bestimmt.

Die Entodermzellen sondern sich nunmehr in 2 Gruppen, eine vordere, aus etwa 4 Zellen bestehende, ausgezeichnet durch blasse, genau kugelige Kerne mit großem Nucleolus und ein körniges Plasma, das Zellgrenzen nicht erkennen läßt. Dies ist die Anlage des Mitteldarmes. Die zweite Gruppe besteht nur aus 2 Zellen mit sehr großem Kern, den Urgeschlechtszellen. Indem sich der vordere, als Ektodermeinstülpung aufgefaßte Zellstrang an den Mitteldarm anlegt, erweist er sich als Vorderdarm. Die Mundöffnung scheint erst später durchzubrechen, und zwar ventral von der Rüsselzelle. Der aus dem Ektoderm eingewanderte oder abgeschnürte Strang im Hinterende nimmt Hufeisenform an und wächst so zu beiden Seiten des Mitteldarmes nach vorn. Das Plasma der Zellen erscheint ebenfalls körnig, so daß das ganze Gebilde deutlich hervortritt. Wir haben es hier mit der Anlage des Exkretionsapparates zu thun, die also im embryonalen Körper einen bedeutenden Raum einnimmt. Da zwischen diesen Bildungen die dunklen Mesenchymzellen liegen, so bietet der Embryo bei schwacher Vergrößerung jetzt ein derartiges typisches Bild dar: Außen eine helle Epidermis mit großen Kernen, innen, in der Mitte eine blasse, granulierte Zone und vorn und hinten eine Masse mit vielen dunklen Kernen.

In der Hüllmembran ist inzwischen auch eine Veränderung eingetreten, über deren Herkunft ich bis jetzt noch nicht ins Klare gekommen bin. Es liegen nämlich etwa von dem Stadium der Epidermisdifferenzierung ab in ihr 4 Kerne. 2 von diesen sind klein, homogen und sehr stark färbbar, also jedenfalls die alten Follikelkerne, 2 sind groß, blasig und zeigen die Struktur der Epidermiskerne. Die Herkunft der letzteren ist mir, wie gesagt, noch nicht klar; es wäre möglich, daß

2 Zellen des Ektoderms jetzt noch in die Hüllmembran eingewandert wären. Sollte sich dies erweisen, so ändert es jedoch nichts an der durch die Entwickelung — zunächst für vorliegende Form — gegebenen Auffassung dieser Membran als Follikel. Um dieses Gebilde zu erledigen, sei bemerkt, daß die meist paarweise zusammenliegenden Kerne später stark abgeplattet werden und in den reifen Miracidien nur noch in degenerierter Form als gefärbte Brocken der stark verdünnten Hüllmembran eingelagert sind. Diese wird schließlich von den ausschlüpfenden Miracidien gesprengt.

Die Veränderungen, die von der besprochenen Stufe zur Ausbildung des Miracidiums führen, sind am besten zu ersehen, wenn wir jetzt den Bau eines fast reifen Embryo ins Auge fassen. Fig. 6 stellt einen solchen von der linken Seite gesehen dar. Die Epidermis besteht aus den 8 großen platten Zellen, von denen nur die annähernd im optischen Schnitte liegenden Kerne gezeichnet sind und der Rüsselzelle (*rsz*). die dorsal die Mundöffnung begrenzt und zu einem vorstreckbaren Rüssel ausgezogen ist. Das Zurückziehen wird durch Muskeln besorgt (*rt*), die dem Vorderdarm (*oe*) entlang ziehen. In die Mundöffnung mündet eine Anzahl birnförmiger Drüsenzellen (*dz*). Der Mitteldarm bildet einen unregelmäßig gestalteten Körper (*md*), der die typischen Kerne aufweist und frei in der ziemlich geräumigen primären Leibeshöhle hängt. In dieser findet man einige wenige verästelte Mesenchymzellen, die meisten liegen wandständig der Epidermis angeschmiegt (*par*). Durch das Wachstum der Larve ist das Exkretionsorgan vollständig hinter den Darm verlagert. Es besteht aus 2 unregelmäßig gestalteten Körpern, die rechts und links in der Leibeshöhle aufgehängt sind, indem sie sich mit den pseudopodienartigen Fortsätzen an der Epidermis befestigen (*ex*); sie enthalten eine Anzahl chromatinreicher Kerne. Hinten vereinigen sie sich zu einem unpaaren Stamme, der mit einer Art von Sammelblase (*sb*) hinten mündet. Zwischen den beiden Exkretionskörpern (*ex*), wie wir hier sagen wollen, ohne auf morphologische Vergleiche mit anderen Tiergruppen einzugehen, liegen die Urgenitalzellen (*uk*). Dorsal über dem Mitteldarme finden wir schließlich noch unter der Epidermis eine Zellgruppe (*g*), die das Centralnervensystem darstellt. Es sind dies jene 3 Zellen, die noch bis zu allerletzt innerhalb der Epidermis gelegen hatten. In der Abbildung ist dann noch innerhalb der Hüllmembran je ein Kern jeder Art (*hmk*[1], *hmk*[2]) zu sehen. Von hier ab sind es dann nur noch geringfügige Veränderungen, die zur Ausbildung des reifen Miracidiums führen.

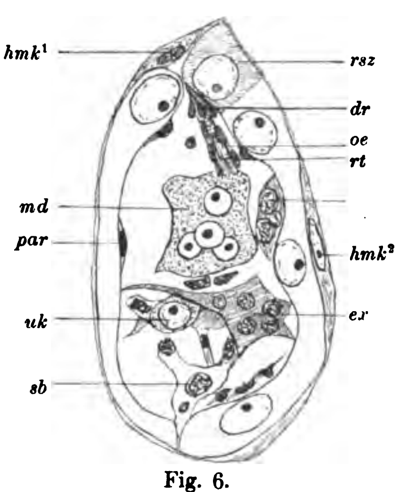


Fig. 6.

Auf die bezügliche Litteratur soll erst in der ausführlichen Abhandlung eingegangen werden, wo dann auch die sich ergebenden vergleichenden Betrachtungen ihren Platz finden werden.

Heidelberg, den 28. August 1902.

Nachdruck verboten.

Zwei neue Distomen.

[Aus dem Zoologischen Institut in Greifswald.]

Von Dr. **Ludwig Cohn.**

Mit 5 Figuren.

Liolope copulans n. gen. n. sp.

Im Magen und Darm eines *Cryptobranchus japonicus* fand Prof. G. W. Müller 1897 einen Distomen in sehr großer Anzahl, der mit Wahrscheinlichkeit zu den heimatlichen Parasiten des Tieres zu rechnen ist, da der *Cryptobranchus* damals erst 4 Wochen in Europa war. Die 1,5 mm langen und an der breitesten Stelle 0,75 mm breiten Distomen sind hinten breit abgerundet, vorn verschmälert und wölben die Ränder sowie das Vorderende meist mehr oder weniger nach der Bauchseite zu, so daß sie löffelartig aussehen. Der dorsoventrale Durchmesser ist sehr gering, 0,2 mm.

Der Mundsaugnapf, der sich nach vorn und unten öffnet, ist rundlich, mit einem Durchmesser von 0,13 mm. An ihn schließt sich der kleine, 0,07 mm lange Pharynx unmittelbar an. Ein Oesophagus fehlt. Dem Pharynx liegt die Darmgabelung an; die Darmschenkel sind relativ breit und ziehen bis ans Hinterende, wo sie, beide nach innen zur Mittellinie abbiegend, sich einander zuwenden, ohne sich je zu berühren. Bei einem Exemplar fand ich ein unregelmäßiges Verhalten, indem es neben dem normal entwickelten einen Darmschenkel einen stark verkürzten zweiten aufwies, der nur bis zur Vesicula reichte.

Zwischen den Darmschenkelenden tritt am Hinterende die Exkretionsblase durch, die sich centripetal kolbenartig erweitert und den hinteren Hoden erreicht. Hier teilt sie sich in die beiden Exkretionskanäle, die nach außen zu von den Darmschenkeln und, wie diese der dorsalen Fläche genähert, dem Vorderende zustreben.

Nicht weit hinter der Darmgabelung, etwa an der Grenze des ersten Viertels der Gesämtlänge, liegt der kleine ventrale Saugnapf, sehr flach und mit kleinem Lumen. Sein Durchmesser beträgt 0,16 mm, wenig mehr als der des Mundsaugnapfes.

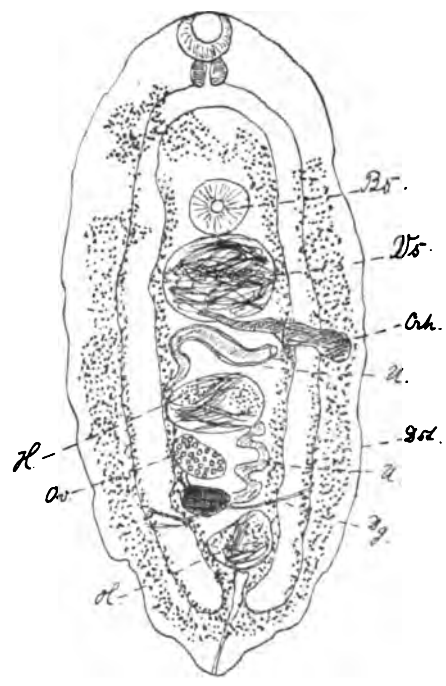


Fig. 1. *Liolope copulans* von der Ventralseite. Totalpräparat.
Bs Bauchsaugnapf, *Crh* Cirrhus, *Dg* Dottergang, *Dst* Dotterstock, *H* Hoden, *Ov* Ovarium, *U* Uterus, *Vs* Vesicula seminalis.

Die beiden Hoden liegen weit voneinander entfernt: der eine dicht

hinter der Mitte der Körperlänge, der andere ganz am Hinterende, wo er von den Darmschenkelenden umfaßt wird. Der vordere ist meist der größere und mehr rundlich, während der hintere eckiger ist. Sie messen 0,20—0,25 : 0,14—0,18. Die Vasa efferentia konnte ich nicht sehen. Sie führen in eine gewaltig große Vesicula, die schon dem bloßen Auge als weißer Punkt auf der Bauchfläche auffällt. Dicht hinter dem Bauchsagnapf gelegen, über dessen dorsale Fläche sie manchmal noch hinübergreift, mißt sie 0,30 : 0,26 mm im Mittel, doch habe ich bei einzelnen Exemplaren auch bis 0,45 mm gemessen. Seitlich am Hinterende links (von der Bauchfläche aus gesehen) geht der Canalis ejaculatorius ab und verläuft quer durch das Mittelfeld nach dem großen Genitalatrium. Der Cirrhusbeutel enthält nur den Samengang. Der Cirrhus ist sehr lang, ich habe ihn bis zu 0,4 mm vorgestreckt gesehen. Sein proximaler Teil ist bestachelt, ebenso der kolbenförmig aufgetriebene Endteil, den radiäre Stacheln umgeben. Der Genitalporus liegt etwa in der Mitte der Körperlänge zwischen der Vesicula und dem vorderen Hoden, und zwar seitlich von der Mittellinie immer auf der rechten Seite.

Das Ovarium ist weit nach hinten verlagert und liegt gleich hinter dem vorderen Hoden; so viel Exemplare ich auch daraufhin durch-

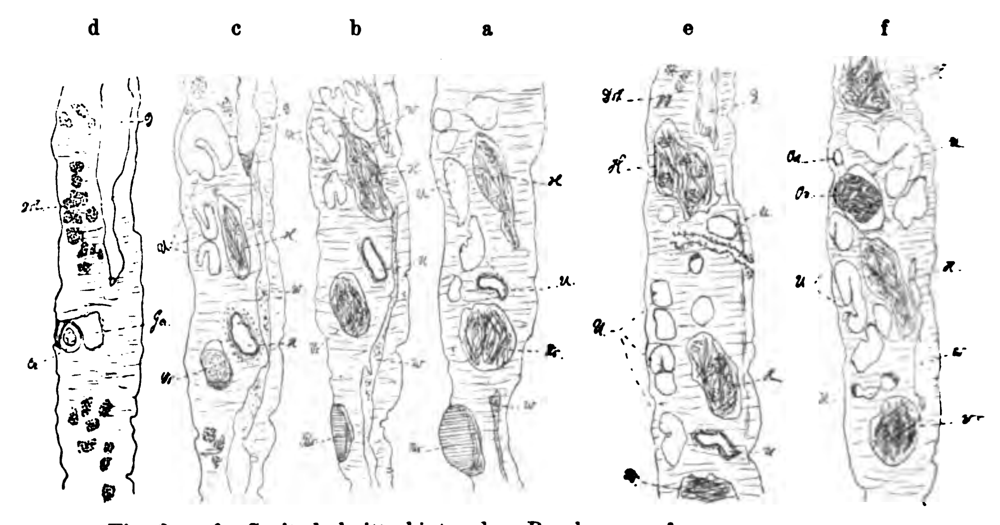


Fig. 2 a—f. Sagittalschnitte hinter dem Bauchsaugnapf.
Buchstaben wie in Fig 1, außerdem: *D* Darm, *Ga* Genitalatrium, *Od* Ovidukt, *W* Wassergefäß.

musterte (ca. 50) — ich fand es immer auf der linken Seite, also auf der am Genitalporus entgegengesetzten. Es ist ein ovales kompaktes Organ von 0,18 : 0,15 mm, das aber manchmal durch eine Einschnürung in der Mitte (in der Einschnürung entspringt dann der Ovidukt) hantelförmig wird. Der Ovidukt geht ventral ab und verläuft nach dem Hinterende zu (Fig. 2*e*). Dicht hinter dem Ovarium liegt ein im Totalpräparat dunkel und einheitlich erscheinender Körper, der aus der Schalendrüse (oder wenigstens zahlreichen, besonders gefärbten Zellen) und einer Höhlung besteht, in welche der Ovidukt mündet. Auf Fig. 2*f* gebe ich die Stelle durch den punktierten Kreis an, da sie nicht in den betreffenden Schnitt fällt. Hierher mündet auch der Laurer'sche

Kanal, der in fast gestrecktem, sehr langem und etwas nach dem Hinterende geneigten Verlaufe von der dorsalen Fläche herzieht. Ein Receptaculum seminis fehlt. Hierher münden auch die von beiden Seiten heranziehenden Dottergänge. Die Dotterstöcke sind enorm entwickelt. Das Hinterende umziehend, gehen sie an beiden Seiten außerhalb des Darms als dichte Felder kleiner Follikel bis nahe an das Vorderende, insbesondere steigen sie auf der linken Seite häufig höher hinauf. Sie sind der ventralen Fläche genähert und greifen auch zum Teil noch ventral über den Außenrand der Darmschenkel über. Außerdem zieht ein Dotterfollikelstrang jederseits an der Innenseite der Darmschenkel hin. Hinten gehen diese inneren Felder in die äußeren über, vorn reichen sie bis an den Bauchsaugnapf und treten hier untereinander und mit den äußeren Feldern in Verbindung. Im sonstigen Verlaufe kreuzen sie den Darm nicht.

Der Uterus zieht als weiter, stark gewundener Gang (Fig. 2*e*, *f*) von der Schalendrüse erst nach hinten (hinter dem Laurer'schen Kanal) und dorsalwärts, wendet sich dann, den Laurer'schen Kanal kreuzend, quer nach der Ventralseite hinüber und zieht längs dieser in Windungen bis zum vorderen Hoden (Fig. 2*f*). Während er sich hierbei auf der rechten Seite hielt, wendet er sich nun nach der linken hinüber, zugleich auch dorsaler gehend, und verläuft zuletzt im Bogen in das Genitalatrium, wo er am Grunde neben dem Cirrhus mündet (Fig. 2*a*—*d*). Das letzte Ende ist dickwandig und von dichtem Parenchym mit vielen Zellkernen umgeben. Sehr seltsam ist, daß fast kein einziges Exemplar der Distomen, trotz des gut entwickelten Uterus, Eier enthielt — der Uterus war überall leer. Nur in einer Schnittserie fand ich wenige Eier; sie maßen 0,03 : 0,01 mm.

Eine interessante Feststellung gelang mir an diesem *Distomum*: die direkte Beobachtung einer Kopulation durch den Laurer'schen Kanal, der ja hier sehr lang und zugleich relativ sehr weit ist. Im Folgenden gebe ich eine mit dem Zeichenapparat entworfene Skizze der beiden betreffenden Individuen, welche während der Konservierung gerade in Copula waren. Das eine, das in der Zeichnung links liegt, hat dem anderen seine Ventralseite zugekehrt; man sieht das nicht nur an dem hier austretenden Cirrhus, sondern auch an den eingebogenen Seitenrändern des Körpers. Das andere Individuum hat dem ersten den Rücken zugekehrt. Beide haften fest aneinander, was auch bei der starken Bestachelung des Cirrhus und seinem kolbig verdickten Ende nicht wunder nehmen kann. Der Cirrhus des links liegenden Tieres ist mit seinem vorderen Teile zweifellos in den Laurer'schen Kanal des anderen eingesenkt — er bildet die einzige Verbindung zwischen beiden.

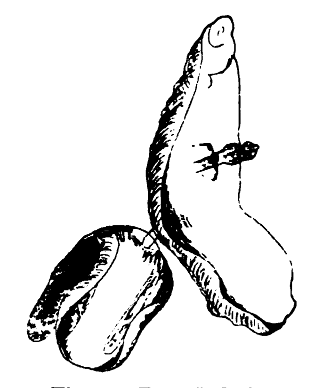


Fig. 3. Zwei Individuen in Kopulation.

Die Basis liegt zwar frei, doch ist bei der großen Länge des Cirrhus das versenkte Ende lang genug, um tief im Laurer'schen Kanal zu haften. Ich wollte die Exemplare nicht unter Deckglasdruck bringen, um sie nicht möglicherweise auseinanderzureißen, doch kann die Deutung gar nicht irrig sein: die Orientierung beider Tiere ist fraglos richtig, und die Eintrittsstelle des Cirrhus liegt so weit von der Genitalöffnung des rechten Tieres nach hinten, wie es beim Laurer'schen Kanal der Fall

ist (Fig. 2*f*). Die zusammenhängenden Exemplare habe ich unversehrt aufbewahrt.

Was die verwandtschaftlichen Beziehungen des Genus anbelangt, so gehört es wohl in die Nähe des Genus *Harmostomum* Braun = *Heterolope* Looss und also in die Subfamilie *Harmastominae*. Hierfür spricht die Lage des Genitalporus, und daß die Samenblase frei im Parenchym liegt. Ebenso trifft hier folgendes zu, was Looss vom Genus *Heterolope* sagt: „Keimdrüsen groß, im äußersten Körperende hintereinander, der Keimstock in der Mitte zwischen den Hoden. Receptaculum seminis fehlt, Laurer-scher Kanal vorhanden". Anders gebaut sind, wenn auch im Prinzip ähnlich, die Dotterstöcke, anders ist der Uterus — doch ist es fraglich, wie er in gefülltem Zustande verläuft. Auch die Größe der Eier würde beide Genera einander nähern.

Leptophyllum stenocotyle n. gen. n. sp.

Im Enddarm einer *Herpetodryas fuscus* aus Südamerika fand ich in größerer Anzahl ein kleines *Distomum* von flach blattförmiger Gestalt; das wenig verengte Vorderende war bei allen nach der Ventralseite umgebogen. Obgleich die Schlange über 10 Jahre in Alkohol gelegen hatte, ist der Erhaltungszustand der Distomen ein recht guter.

Die Länge der Exemplare schwankt wenig und beträgt 1,02—1,1 mm; die größte Breite ist 0,52 mm, während der Sagittaldurchmesser sehr

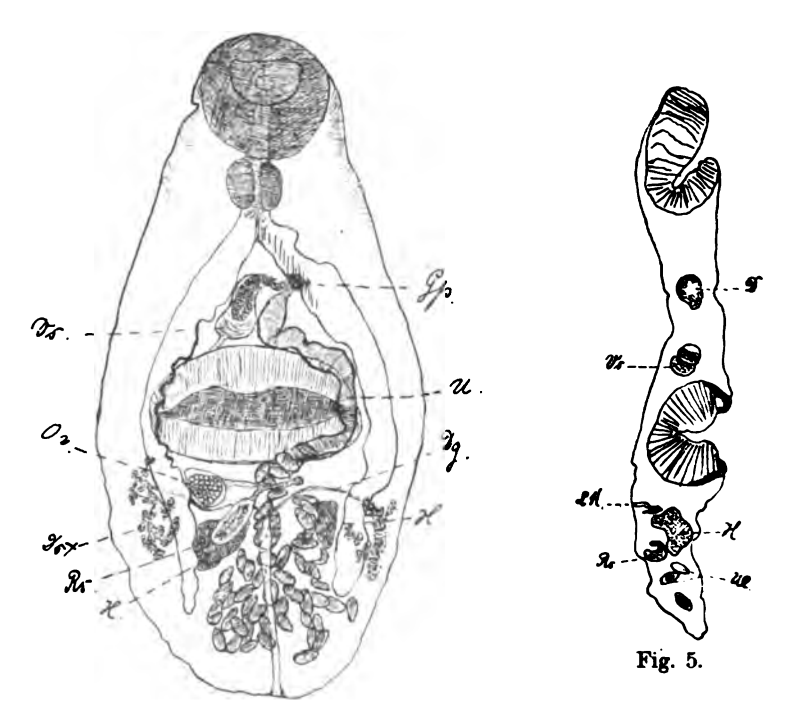


Fig. 4. Fig. 5.

Fig. 4. *Leptophyllum stenocotyle* von der Ventralseite, Totalpräparat. *Gp* Genitalporus, *Rs* Receptaculum seminis, sonst wie in Fig. 1.
Fig. 5. Paramedraner Sagittalschnitt.
Lk Laurer'scher Kanal.

gering ist. Das Hinterende ist stumpf abgerundet, das Vorderende verjüngt sich vor dem Bauchsaugnapf. Der Mundsaugnapf, der sich nach vorn und ventralwärts öffnet, ist in der Flächenansicht rund mit 0,21 mm Durchmesser; ihm fast anliegend, folgt der kleine Pharynx von 0,08 mm Breite. Ein Oesophagus fehlt fast ganz, der Darm gabelt sich nahe hinter dem Pharynx in zwei recht breite Schenkel, die den Bauchsaugnapf im Bogen umgehen und deren Hinterenden wieder der Mittellinie zustreben; sie reichen bis nahe ans Hinterende. Der rechte Schenkel (von der Bauchseite gesehen) reicht etwas tiefer nach hinten hinab.

Von bedeutender Größe ist der Bauchsaugnapf, der stark in die Breite gezogen ist. Bei einer Breite von 0,31 mm ist er nur 0,17 mm lang, und dementsprechend erscheint auch sein Lumen als schmaler, quergestellter Schlitz. Der Exkretionsporus liegt am Hinterende median, und vor ihm steigt der dorsalen Fläche genähert, eine langgestreckte Exkretionsblase von gleichmäßiger Breite nach vorn, bis in die Höhe der weiblichen Genitaldrüsen. Ihre Verzweigung konnte ich nicht sehen.

Die Geschlechtsdrüsen sind auf ein schmales Querband hinter dem Bauchsaugnapf zusammengedrängt. Am nächsten beim Bauchsaugnapf liegt seitlich das Ovarium, etwa ovoid, 0,08 : 0,05 mm groß, mit wenigen, relativ großen Eiern. Mehr nach hinten folgen die beiden Hoden von 0,1 mm, unregelmäßig dreieckig, auf beiden Seiten den Darmschenkeln nahe anliegend. Sie liegen nicht auf gleicher Höhe, vielmehr ist der mit dem Ovarium auf der gleichen Seite liegende etwas nach hinten gerückt. Das Vas deferens biegt rechts (immer von der Bauchfläche aus) um den Bauchsaugnapf und mündet vor demselben, rechts von der Mittellinie in eine große Vesicula seminalis, welche mit dem kräftigen Cirrhus zusammen im birnförmigen Cirrhusbeutel liegt. Dieser zieht von der Einmündungsstelle des Vas deferens quer nach vorn und links, überschreitet die Mittellinie und mündet auf der linken Seite, ventral von dem Innenrande des linken Darmschenkels.

Die Dotterstöcke, 0,1 mm lang und meist nicht ganz symmetrisch gelagert, bestehen aus einer nur geringen Zahl von Follikeln, die stellenweise dicht bei einander liegen, so daß ein kompaktes Organ zu bestehen scheint. Sie liegen ganz dorsal außerhalb des Darms und umgreifen ihn dorsal zum Teil; ventral reichen sie weiter hinab, als die Dicke der Darmschenkel, umfassen sie aber nicht. Am vorderen Ende der Dotterstöcke geht je ein Dottergang ab, während die einzelnen Follikel miteinander durch Längsgänge in Verbindung stehen. Etwa in der Mittellinie stoßen beide Dottergänge zusammen.

Das Receptaculum seminis, eine langgestreckte Blase von 0,12 mm Länge, liegt auf der Seite des Ovariums dorsal vom Hoden, über den es nach vorne zu hinausragt. Die Verbindung des Receptaculum mit dem Laurer'schen Kanal und dieser selbst sind in Fig. 4, wie aus Fig. 5, einem Sagittalschnitt, hervorgeht, schematisiert. Der Laurer'sche Kanal mündet etwa an der Grenze des letzten Viertels der Körperlänge an der Dorsalfläche und zwar, ebenso wie der Cirrhusbeutel und Uterus, seitlich von der Medianlinie auf der linken Seite. Nach anfänglich dorsoventralem Verlaufe biegt er wieder um und zieht zu dem dorsal gelegenen Receptaculum. Eine Schalendrüse konnte ich auf meinen Schnitten nicht mehr konstatieren, da sich die Gewebe nur schwach färbten.

Der Uterus zieht anfänglich in den hinteren Teil des *Distomum*, wo er, ventral von der Exkretionsblase, doch, soweit er bis zu ihnen hinauf reicht, dorsal von den Hoden mehrere, aber wenig zahlreiche Schlingen

bildet. Eine aufsteigende Schleife deckt dorsal den linken Hoden, nie aber den rechten, so daß der Uterus links höher nach vorne reicht. Zuletzt wendet er sich wieder der Mittellinie zu und geht, seinen ersten absteigenden Ast dorsal deckend, nach vorne bis zum Bauchsaugnapf, biegt hier links ab und verläuft um ihn herum, dorsal seinen Seitenrand deckend. Vor dem Bauchsaugnapf angelangt, strebt er erst der Mittellinie zu, wendet sich dann aber wieder seitwärts nach links zurück, so daß er dicht hinter dem Cirrhusbeutel (ein gemeinsames Genitalatrium konnte ich nicht konstatieren) links von der Mittellinie ausmündet. Der ganze den Bauchsaugnapf umkreisende Teil ist stark verbreitert und dickwandig. Die Eier sind in geringer Zahl vorhanden (ca. 30—40) und recht groß, 0,04 : 0,017 mm.

Die Konfiguration der inneren Organe veranlaßt mich, *Leptophyllum* in die Nähe des Genus *Enodiotrema* Looss zu stellen. Wenn es sich auch durch die äußere Gestalt von ihm und den nahverwandten Genera unterscheidet, so findet sich doch eine ganze Reihe verbindender Merkmale. Mit *Enodiotrema* hat *Leptophyllum* gemein neben der dünnen, glatten, stachellosen Haut und der Herkunft aus Reptilien, die ganze Lagerung der Genitaldrüsen und -Gänge, wobei selbst die seitliche Verlagerung des Genitalporus und die Uebereinanderlagerung des auf- und des absteigenden Uterusastes zutreffen. Abweichend ist das Größenverhältnis der Saugnäpfe und das Vorhandensein eines dünnen und langen Oesophagus bei *Enodiotrema*. Die Form der Hoden und der Dotterstöcke weist hingegen mehr nach *Styphlodora* hin.

Eine neue Cysticercus-Form, Cysticercus Taeniae Brauni Setti.

Von Dr. v. **Linstow** in Göttingen.

Mit 4 Figuren.

Herr Dr. J. Jeffrey Bell in London hatte die Güte, mir einen merkwürdigen *Cysticercus* zu schicken, der unter der Haut einer ägyptischen Springmaus, *Gerbillus pyramidum*, gefunden war. Es ist eine gelappte, weiße Blase, 12 mm breit und lang, 5 mm dick, besetzt an der Außenseite mit mehreren Hundert zu Gruppen vereinigter, gelblicher, außen kugelförmiger Körper, die 0,63—0,55 mm groß sind; jeder von ihnen enthält einen zurückgestülpten Scolex mit 4 Saugnäpfen, die 0,13—0,18 mm groß sind, und einen Kranz von 2×15 Haken; die größeren messen 0,114 mm, die kleineren 0,047 mm; die Form ist aus der Abbildung ersichtlich; den kleineren fehlt der Wurzelast. Auf Längsschnitten erkennt man, daß die Körper 0,79 mm lang sind und außen der gemeinsamen Membran aufsitzen, die wir Blastogen nennen wollen; dieselbe ist 0,062 mm dick und zeigt an der Innenseite rundliche Erhabenheiten; das Gewebe ist von zahlreichen, sich in allen Richtungen kreuzenden Bindegewebszügen durchsetzt. Die Außenmembran der Körper trägt Ringleisten, unter ihr verläuft eine Schicht Ringmuskeln; im Gewebe der Körper selber erkennt man Faserzüge und dichtgedrängte, ovale Kalkkörperchen von verschiedener Größe; durchschnittlich sind sie 0,0156 mm lang und 0,0091 mm breit; bald sind sie hyalin, bald gelblich, meistens sieht man sie granuliert, und mitunter haben die Granula eine radiäre Anordnung.

Mégnin[1]) beschrieb unter dem Namen *Coenurus polytuberculosus* einen *Cysticercus*, der unter der Haut von *Dipus sagitta* gefunden war; es war eine unregelmäßig gestaltete, gelappte Blase, die an der Innenseite kleine Köpfchen trug, die sich als Scoleces erwiesen; auch hier fand sich ein doppelter Hakenkranz, die Haken waren aber 0,07 und 0,05 mm groß; die Form kann also mit der unserigen nicht vereinigt werden.

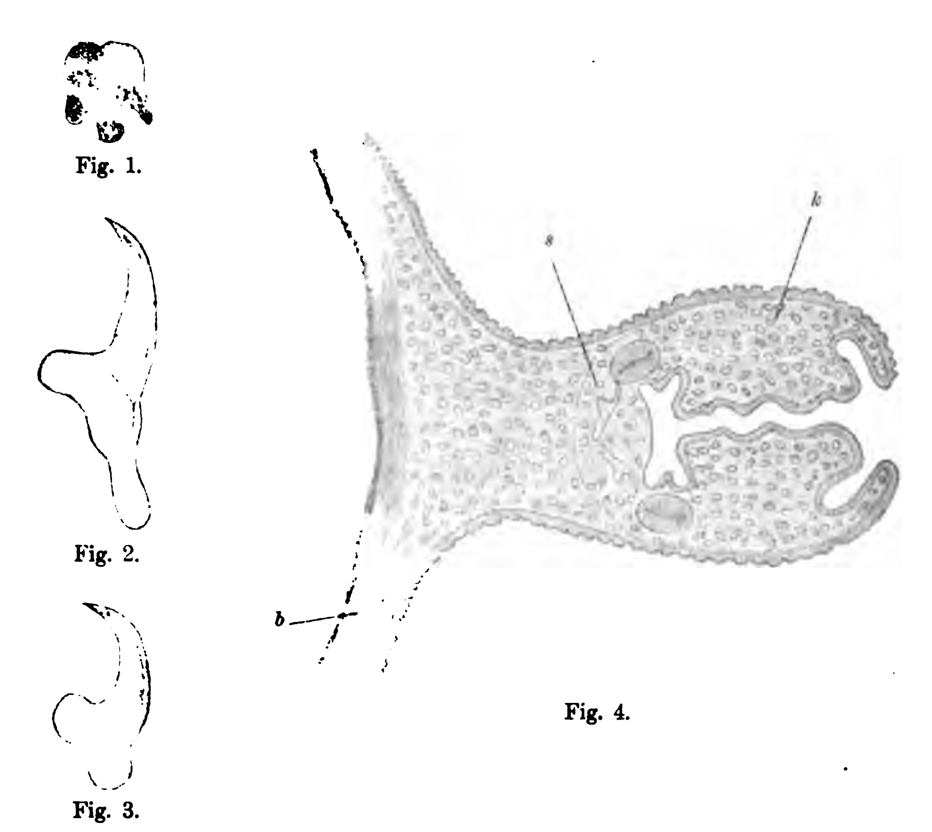


Fig. 1. Fig. 2. Fig. 3. Fig. 4.

Fig. 1. *Cysticercus* aus *Gerbillus pyramidum* in natürlicher Größe; Oberfläche der gelappten Blase außen mit Gruppen von runden Knötchen bedeckt, welche aus Körper und Scolex bestehen.

Fig. 2. Größerer Haken.

Fig. 3. Kleinerer Haken.

Fig. 4. Längsschnitt durch die Mitte eines Knötchens; *b* Blastogen, *k* Körper, eingestülpt, *s* Scolex mit Saugnäpfen und Haken; eine vom Blastogen differenzierte Schwanzblase ist nicht entwickelt.

Als man noch nicht wußte, daß die Blasenwürmer als die Larven der Tänien anzusehen seien, gab man ihnen besondere Gattungsnamen, und Villot behielt dieselben bei, und führt an *Cysticercus*, *Coenurus*, *Echinococcus*, *Polycercus*, *Monocercus*, *Cercocystis*, *Staphylocystis*, *Urocystis* und *Cryptocystis*. Braun teilt die Cysticerken in 4 Gruppen: *Plerocercus*, *Plerocercoïd*, *Cysticercus* und *Cysticercoïd*.

1) Journ. anat. et phys. T. XVI. Paris 1880. p. 181—191. tab. VII—X.

Daß man den Cysticerken, nachdem man ihr Wesen erkannt hat, keine Gattungsnamen geben darf, ist wohl klar; bestimmt man doch bei den Insekten auch die Genusnamen nicht nach den Larven, sondern nach den geschlechtsreifen Tieren.

Andere, teils ältere, teils jüngere, Gattungsnamen der Cysticerken sind *Scolex*, *Gryporhynchus*, *Piestocystis*, *Dithyridium*, *Milina*. Daß auch aus anderen Gründen eine Gattungsbezeichnung nicht richtig ist, erkennt man, wenn man bedenkt, daß Tänien, deren Bau außerordentlich ähnlich ist, aus grundverschiedenen Cysticerken hervorgehen hönnen, wie *Taenia solium* und *Taenia coenurus*.

Versuchen wir, die Cysticerken der Tänien in Gruppen zu ordnen, so müssen wir zunächst feststellen, daß sie bestehen aus:

1) Dem Blastogen, hervorgegangen aus der mit 6 Häkchen bewaffneten Oncosphäre, das bei vielen Formen als schwanzartiger Anhang erscheint;

2) der Schwanzblase oder Blase;

3) dem ein- und ausstülpbaren Zwischenstück oder dem Körper und

4) dem Kopf oder Scolex mit 4 Saugnäpfen, oft mit Rostellum und Haken, mitunter gefolgt von einer soliden, halsartigen Verlängerung.

So kann man die Cysticerken in folgender Weise einteilen:

A. Aus einem Tänienei entsteht ein *Cysticercus*.

1. Form. Vollständig differenziert in Blastogen, Schwanzblase, Körper und Scolex; diese Form ist in zahlreichen Arten beschrieben von Hamann, Mrázek, Rosseter, v. Daday und mir; die meisten gehören zu Vogeltänien und das Blastogen ist eine oft lange, schwanzförmige Verlängerung, auf der man die 6 Häkchen der Oncosphäre erkennt; Körper und Scolex können aus der Schwanzblase ausgestülpt werden; *Cercocystis* nach Villot.

2. Form. Blastogen, Körper, Schwanzblase und Scolex sind von einer Parenchymschicht umgeben; *Cysticercus Taeniae diminutae* Rud. nach Grassi und Rovelli und *Cysticercus* von *Taenia acanthorhynchus* Wedl nach dem Verf.

3. Form. Das Blastogen umhüllt rings Schwanzblase, Körper und Scolex; hierher gehören *Monocercus Glomeridis* Villot, *Cysticercus Lumbriculi* Ratzel, *Cysticercus Taeniae cuneatae* v. Linst. nach Grassi und Rovelli, *Cysticercus Taeniae botrioplitis* Piana, *Cysticercus Arionis* v. Siebold.

4. Form. Blastogen frei, Schwanzblase und Körper verschmolzen; *Cysticercus Taeniae integrae* Hamann.

5. Form. Scolex, Körper und Schwanzblase verschmolzen, Blastogen frei; *Cysticercus Taeniae ellipticae* Batsch nach Grassi und Rovelli; *Cryptocystis* nach Villot.

6. Form. Schwanzblase und Blastogen verschmolzen; *Cysticercus Taeniae proglottinae* Davaine nach Grassi und Rovelli; *Cysticercus Taeniae sinuosae* Zed. nach Hamann.

7. Form. Blastogen mit der Schwanzblase verschmolzen, oder die letztere geht direkt aus dem ersten hervor; *Cysticercus cellulosae* Rud. = *Taenia solium* Lin. und viele verwandte Arten.

8. Form. Blastogen und Schwanzblase sind so klein, daß sie Körper und Scolex nicht aufnehmen können, so daß der Körper tänienartig aussieht; *Cysticercus fasciolaris* Rud. = *Taenia crassicollis* Rud.

9. Form. Blastogen und Schwanzblase zu einem soliden Körper verschmolzen, ohne Blasenbildung; *Piestocystis variabilis* Diesing und

andere *Piestocystis*-Arten; Körper und Scolex einstülpbar; *Gryporhynchus* Aubert; *Dithyridium* Leuckart.

10. Form. Der ganze Körper undifferenziert, Vorderteil nicht einstülpbar; *Plerocercoïd*; *Cysticercus Lacertae* v. Linst., *Cysticercus Taeniae torulosae* Batsch nach Leuckart aus *Cyclops serrulatus*, *Cysticercus* aus *Cyclops agilis* nach Mrázek; *Milina grisea* van Beneden aus *Vespertilio serotinus*.

11. Form. Blastogen, Schwanzblase, Körper und Scolex verschmolzen; *Cysticercus Taeniae murinae* nach Grassi und Rovelli.

B. Aus einem Tänienei entstehen viele Cysticerken.

12. Form. Schwanzblase, Körper und *Scolex* entstehen innerhalb des Blastogen und lösen sich von letzterem; *Polycercus* Villot, *Echinococcus* Mecznikoff aus *Lumbricus terrester*; *Polycercus* aus *Didymogaster sylvatica* nach Haswell und Hill.

13. Form. *Cysticercus botryoides* Böttcher; an der Innenseite des blasenförmigen Blastogen entstehen durch Knospung Cysticerken, bestehend aus Schwanzblase, Körper und Scolex, die mit dem Blastogen verwachsen bleiben, und von diesen Cysticerken, die Tochtercysticerken genannt werden können, knospen wieder Enkelcysticerken; von Böttcher *Coenurus botryoides* genannt.

14. Form. Schwanzblase, Körper und Scolex entwickelt, die durch äußere Knospung aus dem Blastogen entstehen und traubige, vielköpfige Konglomerate bilden, die durch Stiele verbunden sind; *Staphylocystis* Villot.

15. Form. Aehnlich wie die vorige Form, aber das Blastogen ist hinfällig und die Cysticerken werden frei; *Urocystis* Villot.

16. Form. Das Blastogen erzeugt an der Innenseite durch Knospung Tochtercysticerken, bestehend aus Schwanzblase, Körper und Scolex, die sich ablösen und von deren Schwanzblase durch Knospung nach außen Enkelcysticerken entstehen; *Cysticercus longicollis* Rud. = *Taenia crassiceps* Rud., aus *Talpa* und *Spermophilus* nach Braun und Bott.

17. Form. An der Innenwand des blasenförmigen Blastogen entstehen Knospen, die sich zu Körper und Scolex entwickeln; Schwanzblase nicht besonders entwickelt oder mit dem Blastogen identisch; *Coenurus cerebralis* Rud., *Coenurus serialis* Gervais, *Coenurus polytuberculosus* Mégn., *Coenurus Lemuris* Cobbold, *Coenurus Spalacis* Dies., *Coenurus* aus *Myopotamus* nach Pagenstecher.

18. Form. Das Blastogen wird zu einer Blase, die man mit der Schwanzblase identifizieren kann, an deren Außenseite Knospen entstehen, die zu Körper und Scolex werden; unsere Form aus *Gerbillus*.

19. Form. Das Blastogen entwickelt sich zu einer Blase, in der Tochter- und Enkelblasen entstehen können, und an der Innenwand dieser Knospen Köpfe, die sich zu Scoleces entwickeln; Schwanzblase und Körper fehlen; *Echinococcus polymorphus* Dies. = *Taenia echinococcus* v. Sieb., der keine *Cysticercus*-, sondern eine *Scolex*-Kolonie ist.

Unsere Kenntnis der Cysticerken ist noch eine höchst lückenhafte; zur Zeit sind etwa 570 Tänienarten beschrieben, zu denen eine ebenso große Anzahl Cysticerken gehört; von letzteren kennen wir aber erst etwa 120 Arten; es ist also anzunehmen, daß die vorstehend angeführten 19 Formen in Zukunft eine große Bereicherung erfahren werden.

Ich glaube die Tänien, zu welcher unser *Cysticercus* aus *Gerbillus* gehört, zu kennen; es wird die *Taenia Brauni* sein, welche Setti[1])

1) Nuovi elminti dell'Eritrea. (Atti soc. Ligust. sc. nat. e geogr. Ann. VIII. Fasc. II. Genova 1897. p. 15—19. tab. VIII. fig. 9–14.)

in Afrika im Hunde fand. Die Länge beträgt 150—180 mm, die Breite hinten 6 mm; die letzten Proglottiden, welche reife Eier enthalten, sind länger als breit; die Geschlechtsöffnungen stehen unregelmäßig abwechselnd; die Kalkkörperchen sind sehr zahlreich; der innere Bau entspricht dem der *Taenia coenurus* Küchenm.; am Scolex finden sich 2×15 Haken, von denen die größeren 0,095—0,100—0,130—0,140 mm, die kleineren 0,070—0,075—0,085—0,090 mm lang sind; sie entsprechen in Anzahl, Form und Größe denen unseres *Cysticercus* aus *Gerbillus*, und da auch das Vaterland von *Cysticercus* und *Taenia* benachbart sind, so glaube ich, daß beide zusammengehören; die Eier der Tänie sind 0,035—0,038 mm groß.

Notizen zur Helminthologie Egyptens. V.

Eine Revision der Fasciolidengattung Heterophyes Cobb.[1]

Von Dr. **A. Looss,** School of Medicine, Cairo.

Infolge einer äußeren Veranlassung hatte ich kürzlich das von mir im Laufe der Zeit gesammelte Material von „*Distomum heterophyes*" und „*Dist. fraternum*" einer erneuten Inspektion zu unterwerfen; dies geschah unter Zugrundelegung derjenigen Anforderungen, welche wir meiner Ueberzeugung nach heutzutage an die Definition der natürlichen Distomenspecies stellen müssen. Als Resultat der Untersuchung ergab sich, daß keine der beiden Arten, so wie ich sie bisher aufgefaßt hatte, in Wirklichkeit einheitlich ist, sondern sich aus mehreren zusammensetzt. Die Unterscheidung dieser wirklichen Species wird, von der geringen Körpergröße der Individuen und ihrem fast identischen inneren Baue abgesehen, in dem einzelnen Falle besonders noch durch zwei Umstände erschwert, nämlich einmal dadurch, daß während des individuellen Wachstums nach Eintritt der Geschlechtsreife der Bauchsaugnapf in stärkerem Grade an Größe zunimmt als der Mundsaugnapf, daß damit also das Größenverhältnis der drei Näpfe innerhalb der Species in gewissen Grenzen variiert, und zweitens durch eine ganz auffallende Neigung der Tiere zu Mißbildungen. Die erstere Thatsache ist schon bei anderen Arten konstatiert worden und besitzt möglicherweise eine allgemeine Giltigkeit für die Distomen. Bei der Mehrzahl der hier in Rede stehenden *Heterophyes*-Arten hält sich nun diese Größenzunahme des Bauchsaugnapfes in den bisher beobachteten, ziemlich engen Grenzen, bei einigen anderen aber nimmt sie — soweit

---

1) Nach Stiles (Notes on parasites. 51: The lung fluke [*Parag. Westermanii*] etc., 16th An. Rept. Bureau of Anim. Industry 1899. 1900. p. 563. Anm.) hat Cobbold für das *Dist. heterophyes* v. Sieb. die Gattung *Heterophyes* aufgestellt. Wenn dem so ist (der Ort ist von Stiles meines Wissens bisher nicht angegeben worden)[2]), so hat der Genusname *Heterophyes* Priorität vor den später aufgestellten Namen *Coenogonimus* und *Cotylogonimus*; da die Cobbold'sche Gattung ferner auf *Dist. heterophyes*, eine sicher erkennbare Art, basiert und damit einwandsfrei definiert ist, so ist ihr Name auch prioritätsberechtigt.

2) Laut brieflicher Mitteilung von Dr. Stiles hat Cobbold den Gattungsnamen *Heterophyes* in seinem 1866 zu London erschienenen Werke: „Tapeworms (human entozoa), their sources, nature and treatment" p. 6 aufgestellt. M. Br.

wenigstens, als ich die Thatsachen gegenwärtig zu interpretieren imstande bin — Dimensionen an, welche weit über dieses Maß hinausgehen und es äußerst fraglich erscheinen lassen, ob die in Frage kommenden Individuen wirklich einer einheitlichen Species angehören. Ich komme nachher auf diese Fälle besonders zurück. Auch die Neigung der *Heterophyes*-Arten zu kleinen Variationen und namentlich zu Mißbildungen übertrifft alles das, was ich bisher von anderen Trematoden gesehen habe. So begegnet man relativ oft Exemplaren mit einseitig oder beiderseits ungleich verkürzten Darmschenkeln, mit einseitig fehlenden oder reduzierten Hoden u. s. w.; die interessantesten Fälle, die mir aufgestoßen, sind aber zweifellos die, in denen der Bauchsaugnapf mehr oder minder beträchtlich in der Größe zurückgeblieben, nur noch angedeutet und nicht mehr fibrillär differenziert oder schließlich überhaupt nicht zur Ausbildung gekommen war. Ein Hindernis für die Bestimmung des Individuums bilden diese Anomalieen in der Regel nicht.

Was nun zunächst „*Distomum fraternum*" anlangt, so enthält das noch in meinem Besitze befindliche Originalmaterial aus dem Pelikan zwei verschiedene Species, die ich in meiner ersten Beschreibung der Art[1]) in eine zusammengeworfen habe. Diese beiden Arten unterscheiden sich von einander auf folgende Weise:

Heterophyes fraternus (Looss) sens. strict.

Länge des Körpers bei den größten und gestrecktesten Individuen bis zu 0,6 mm, meist 0,4—0,5 mm; Hinterleib dem Vorderkörper gegenüber nur wenig verbreitert, beide durch eine Einbiegung der Seitenränder von einander getrennt. Haut sehr dicht mit längeren, schmalen Schuppen bewaffnet. Bauchsaugnapf und Genitalnapf bei jüngeren Tieren fast gleich groß und deutlich größer als der Mundsaugnapf, bei älteren der Bauchnapf am größten. Die Maße betragen im Mittel 0,05 mm für den Mundsaugnapf, 0,07 mm für den Bauchsaugnapf und 0,06 mm für den Genitalnapf. Auf dem freien Rande des letzteren stehen dicht gedrängt 65—75 gekrümmte Hornstäbchen, die besonders bei zusammengezogener Mündung des Napfes das Bild eines feinen Kammes oder einer Bürste darbieten. Die Darmschenkel reichen stets bis hinter die Hoden und endigen mehr oder minder nahe an der Wand der Exkretionsblase. Die Eier, und zwar auch die reifsten, sind nur hellgelbbraun und erscheinen in aufgehellten Tieren bei voller Oeffnung der Mikroskopblende in leuchtend gelber Farbe mit einem leichten Stich ins Bräunliche.

Heterophyes inops n. sp.

Länge der größten, reichlich mit normalen Eiern erfüllten Exemplare (im konservierten Zustande) 0,46 mm; Hinterkörper dem Vorderkörper gegenüber etwas verbreitert und durch eine schwache Einschnürung von ihm abgesetzt. Bauchsaugnapf ein wenig größer, der Genitalnapf im eingezogenen Zustande[2]) ein wenig kleiner als der Mundsaugnapf.

1) Ueb. d. Bau des *Distomum heterophyes* v. Sieb. etc. Kassel (Th. G. Fisher & Co.) 1894. p. 42 f. Taf. II und: Recherches sur la faune parasitaire de l'Egypte. (Mém. Inst. Egyptien. T. III. 1896. p. 60. Fig. 36, 37. Pl. IV.)

2) Wenn der Genitalnapf nach außen vorgestülpt wird, was bei der Konservierung der Tiere relativ häufig geschieht, nimmt er meist eine Form an, die bis zu einem gewissen Grade dem Hute eines Pilzes gleicht; sein Durchmesser ist dann nicht un-

Die konkreten Maße im Mittel 0,046 mm für den Mundsaugnapf, 0,056 mm für den Bauchsaugnapf und 0,036 mm für den Genitalnapf; der Stachelkranz auf dem letzteren setzt sich aus 25—35 kleinen, durch ziemlich weite Abstände von einander getrennten Stacheln zusammen. Die Bestachelung der Haut besteht aus relativ kurzen und breiten, an ihrem freien Rande in eine Anzahl feinster Spitzen zerspaltener Schuppen, die nicht sehr dicht stehen und dies besonders auf der Bauchseite des Vorderkörpers. Die meist ansehnlich erweiterten Darmschenkel reichen normalerweise nur bis an den Anfang der Hoden, erstrecken sich nicht selten aber auch äußerlich an denselben entlang bis nahe an den Hinterrand, niemals aber über denselben hinaus. Die Dotterstöcke liegen nur unter der Rückenfläche des Körpers. Die Eier sind eben so hellfarbig wie bei der vorigen Art.

Von diesen beiden Species habe ich *Heterophyes fraternus* bis jetzt nur im Pelikan angetroffen; *Het. inops* hingegen kommt in einzelnen Exemplaren auch in *Milvus aegyptius* (= *M. parasiticus*) vor.

In dem Materiale von „*Distomum fraternum*" aus Hunden und Katzen sind zwei unter sich sowohl wie von dem „*Dist. fraternum*" des Pelikans verschiedene Arten enthalten. Sie schließen sich in ihrer Organisation sämtlich an *Heterophyes inops* an, insofern ihr Genitalnapf klein und mit nur wenigen Hornstäbchen, die Haut dagegen mit relativ wenig dicht stehenden, breiten und derben Schuppen bewaffnet ist.

Heterophyes aequalis n. sp.

Länge der größten Individuen bis zu 0,9 mm; gewöhnlich 0,5 bis 0,7 mm bei 0,3—0,4 mm größter Breite im Hinterkörper. Mundsaugnapf und Genitalnapf sind fast genau gleich groß und schwanken bei geschlechtsreifen Individuen im allgemeinen zwischen 0,05 und 0,06 mm; der Bauchsaugnapf ist merklich größer und mißt je nach dem Alter der Tiere von 0,07 bis zu 0,09 mm. Die durch ihre Weite sich auszeichnenden Darmschenkel endigen, vielfach beiderseits nicht auf gleicher Höhe, zwischen Vorder- und Hinterrand der Hoden. Die aus derben Follikeln aufgebauten Dotterstöcke liegen ausschließlich unter der Rückenfläche. Eier in den vordersten Uterusschlingen lebhaft braun und selbst bei den allerjüngsten Individuen mit erst ganz wenig Eiern bereits deutlich tiefer gefärbt als die Eier von *H. inops*; an diesem Unterschied sind beide Arten leicht zu unterscheiden. *Heterophyes aequalis* ist normaler Weise augenscheinlich ein Bewohner der Katze, findet sich in einigen verstreuten Exemplaren aber sehr oft auch im Hunde.

Heterophyes dispar n. sp.

Erreicht in einzelnen ganz ausgewachsenen und alten Exemplaren bis 1 mm Länge bei 0,3—0,4 mm Breite im Hinterkörper; die gewöhnliche Länge reifer Tiere beträgt 0,8—0,9 mm. Hautschuppen sehr groß und schon in der Körpermitte durch relativ weite Zwischenräume von einander getrennt. Mundsaugnapf und Genitalnapf wiederum nahezu gleich groß, letzterer mit ungefähr 30 kleinen Hornstäbchen bewaffnet.

beträchtlich größer als im eingezogenen Zustande. In letzterem ist der eigentliche Genitalnapf ferner stets von einer relativ dicken Lage konzentrisch geschichteten Parenchymgewebes umhüllt; die oben gegebenen Maße für den Genitalnapf beziehen sich nur auf diesen unter Ausschluß seiner Parenchymhülle.

Bauchsaugnapf auffallend mächtig, bei jungen Tieren ungefähr von dem doppelten, bei alten von beinahe dem dreifachen Durchmesser des Mundnapfes. Konkrete Maße im Mittel: Mundsaugnapf 0,068 mm, Bauchsaugnapf (gewöhnlich der Quere nach verlängert) 0,168 mm breit bei 0,146 mm Länge, Genitalnapf 0,072 mm. Darmschenkel nicht auffallend weit, außerhalb an den Hoden vorbei bis an deren Hinterrand oder bis an die Exkretionsblase reichend. Reife Eier tief dunkelbraun.

Der normale Wirt dieser Art ist augenscheinlich der Hund; in der Katze finden sich nur gelegentlich vereinzelte Exemplare.

Die bisher unter dem Namen „*Distomum heterophyes*" zusammengefaßten Arten schließen sich in Bezug auf ihre, aus dicht gedrängt stehenden, relativ schmalen Schuppen bestehende Hautbewaffnung und ihren großen, mit einem Kranze von 70—80 gekrümmten Hornstäbchen besetzten Genitalnapf an *Heterophyes fraternus* des Pelikans an.

Heterophyes heterophyes (v. Sieb.).

Einfach (i. e. ohne Schütteln) in Sublimat konservierte Tiere messen 1—1,3 mm in der Länge und gehen über letzteres Maß kaum jemals hinaus. Der Vorderkörper ist dann nach vorn mehr oder minder stark verjüngt, der Hinterkörper auf 0,6 mm und darüber verbreitert, beide Körperabschnitte durch eine Einschnürung meist deutlich von einander gesondert. In Sublimat oder Alkohol geschüttelte reife Exemplare strecken sich auf 1,6—1,7 mm; der Körper ist dann in ganzer Ausdehnung 0,3—0,4 mm breit, die mittlere Einschnürung ausgeglichen und manchmal sogar durch eine vom Bauchsaugnapf verursachte Ausbuchtung der Körperränder ersetzt. Bauchsaugnapf sehr muskelkräftig und dickwandig, ungefähr $2^1/_4$—$2^3/_4$mal, Genitalnapf ungefähr $1^1/_2$mal so groß wie der Mundsaugnapf. Konkrete Mittelmaße: Mundsaugnapf 0,09 mm, Bauchsaugnapf 0,23 mm, Genitalnapf 0,15 mm. Darmschenkel dünn, endigen hinten an der Exkretionsblase. Die seitlichen Enden der Dotterstöcke erscheinen, von der Bauchseite gesehen, noch außerhalb der Darmschenkel und einzelne Follikel greifen oft ganz auf die Bauchseite über. Eier lichtbraun.

Das von mir bis jetzt aus dem Menschen gesammelte Material von „*Distomum heterophyes*" besteht ausschließlich aus der hier charakterisierten Species; dieselbe repräsentiert ferner die gewöhnlichste und am massenhaftesten auftretende *Heterophyes*-Art des Hundes, findet sich dagegen nur selten und meist auch nur in wenigen Exemplaren in der Katze.

Das Material von „*Distomum heterophyes*" aus dem Fuchs scheint mir leider verloren gegangen zu sein.

Heterophyes pallidus n. sp.

„*Distomum heterophyes*" als *Milvus aegyptius* (= *M. parasiticus*) ähnelt dem echten *H. heterophyes* zwar beträchtlich, ist aber doch nicht diese Species. Maximalgröße mäßig gestreckter Individuen 0,95 mm bei 0,38 mm Hinterleibsbreite; stärker kontrahierte messen meist 0,75 bis 0,8 mm und sind hinten 0,4—0,5 mm breit. Bauchsaugnapf stets mehr als doppelt (2—$2^1/_4$mal) so groß als der Mundsaugnapf; der Genitalnapf hat ungefähr $^2/_3$ vom Durchmesser des Bauchsaugnapfes. Konkrete Maße im Mittel: Mundsaugnapf 0,062 mm, Bauchsaugnapf 0,15 mm,

Genitalnapf 0,104 mm. Auffallend bei dieser Art ist die helle Farbe der Eier, infolge deren der Hinterkörper der ganzen Tiere nur gelblich gefärbt erscheint. Soweit ich bis jetzt gesehen, ist diese Art auf *Milvus* beschränkt.

Die specifische Identität der bisher charakterisierten Arten ist, soweit meine Erfahrung reicht, niemals zu verkennen. Außer ihnen finden sich aber, und oft in Massen, Individuen, über deren Zugehörigkeit ich ein sicheres Urteil noch nicht abzugeben vermag. Sie repräsentieren zwei distinkte Erscheinungsformen, die sich in Bezug auf ihren inneren Bau vollkommen anschließen, die eine an *Heterophyes dispar*, die andere an *Het. heterophyes*, sich von den genannten Formen aber durch eine geringere Körpergröße und ein anderes Größenverhältnis der Saugnäpfe unterscheiden; letzteres aber wird ausschließlich durch die abweichende Größe des Bauchsaugnapfes bedingt, da Mundsaugnapf und Genitalnapf denjenigen der Hauptformen gleichen.

Die erstgenannte der beiden Formen habe ich bisher nur in zusammen 23 Individuen in der Katze gefunden. Ihre Unterschiede gegenüber *Het. dispar* bestehen darin, daß der Körper, der bei den größten Individuen 0,85 mm lang ist, nur 0,2 bis höchstens 0,25 mm Breite besitzt, und daß der Bauchsaugnapf nur um die Hälfte bis drei Viertel größer ist als der Mundsaugnapf. Die aus einer Messung der 23 Individuen berechneten konkreten Maße betragen im Mittel: Mundsaugnapf 0,05 mm, Bauchsaugnapf 0,08 mm, Genitalnapf 0,046 mm. Die Eier sind dunkelbraun, aber deutlich heller als bei *Het. dispar*.

Die zweite der angedeuteten zweifelhaften Formen steht zu *Het. heterophyes* in demselben Verhältnis wie die eben beschriebene zu *Het. dispar*, nur tritt sie nicht spärlich, sondern ebenso massenhaft auf wie *Het. heterophyes*. Im Hunde ist sie verhältnismäßig selten; ihr Hauptwirt ist augenfällig die Katze, denn hier habe ich in mehreren Fällen, wo Hunderte von Würmern zugegen waren, nur die abweichende Form konstatieren können. Die größten Exemplare, die ich gesehen, messen voll ausgestreckt (geschüttelt) 1,4 mm bei einer Maximalbreite von 0,4 mm im Hinterkörper; gewöhnlich beträgt die Länge 0,9 bis 1,1 mm, die Breite des Hinterkörpers 0,3—0,35 mm; Bauchsaugnapf ungefähr doppelt so groß wie der Mundsaugnapf, bei jungen Tieren hinter diesem Verhältnis etwas zurückbleibend, bei alten etwas darüber hinausgehend; Genitalnapf fast ebenso groß wie der Bauchsaugnapf und nur bei alten Individuen um ungefähr ein Fünftel kleiner als dieser. Konkrete Maße im Mittel: Mundsaugnapf 0,073 mm, Bauchsaugnapf 0,146 mm, Genitalnapf 0,112 mm. Eier hellgelbbraun und heller als bei *H. heterophyes*, so daß beide Formen an der Farbe ihres Hinterkörpers meist schon bei starker Lupenvergrößerung unterschieden werden können.

Ich würde nun die beiden hier beschriebenen aberranten Formen ohne das leiseste Bedenken als gesonderte Arten in Anspruch nehmen, wenn sich unter ihnen nicht auch Individuen fänden, deren Maßverhältnisse derart an diejenigen der typischen Species heranreichen, daß ohne Kenntnis ihres Wirtes eine sichere Entscheidung, ob sie zu der einen oder der anderen gehören, nicht möglich ist. Sie nehmen so das Aussehen von Uebergangsstadien an; was aber hierbei wiederum auffällt, ist, daß sie durchaus nicht so häufig sind, als man bei dieser Auffassung ihrer Natur erwarten müßte. Bei der Nebenform von *Het. dispar* tritt

dies nicht so deutlich hervor, da ich von ihr nur eine geringe Individuenzahl zur Verfügung habe; bei der Nebenform von *Het. heterophyes* hingegen ist die Menge der unbestimmbaren Individuen geradezu verschwindend im Vergleiche zu der Zahl derjenigen, die auf den ersten Blick als die eine oder die andere Form zu erkennen sind. Dieses Faktum spricht entschieden nicht zu Gunsten einer spezifischen Zusammengehörigkeit beider, denn wären die Mittelformen thatsächliche Uebergangsstadien aus dem kontinuierlichen Wachstum einer und derselben Art, so müßten sie ohne Zweifel wohl häufiger auftreten. Gleichfalls gegen die erwähnte Auffassung spricht der andere Grund, daß dann während der Entwickelung des Individuums nach Eintritt der Geschlechtsreife eine relativ so enorme Größenzunahme des Bauchsaugnapfes einträte, wie sie weder von den übrigen *Heterophyes*-Arten, noch von anderen Distomen, wo sie bisher konstatiert worden ist, auch nur entfernt erreicht würde. Es spielen in die definitive Beantwortung der hier aufgetauchten Frage noch eine Anzahl anderer Umstände und Fragen hinein, für deren Erörterung diese kurze vorläufige Notiz nicht der Ort ist. Im großen und ganzen bin ich so gut wie überzeugt, daß in den abweichenden Formen eigene Species vorliegen; da ich dieselben aber noch nicht objektiv gegeneinander abgrenzen kann, so fühle ich mich auch nicht berechtigt, sie als solche aufzustellen und zu benennen; andererseits erscheint es mir aber praktisch unumgänglich nötig, irgend einen besonderen Namen für sie einzuführen. Die Art und Weise, wie dies zu geschehen hat, bietet ihre Schwierigkeiten, denn da die betreffenden Formen nur entweder selbständige Arten oder Entwickelungszustände sein können, so ist die Annahme von Aberrationen oder Varietäten nicht am Platze. Ich schlage deshalb vor, sie bis auf weiteres, die erste als die „*limatus*-Form des *Het. dispar*“, die zweite als die „*sentus*-Form des *Het. heterophyes*“ zu bezeichnen, indem ich mich hierbei derjenigen Namen bediene, die ich den betreffenden Formen als selbständigen Species eine Zeit lang zugedacht hatte und die wirkliche Speciesnamen werden können, so bald es gelingt, die spezifische Selbständigkeit ihrer Träger festzustellen.

Zur Führung dieses Nachweises reicht das, was wir gegenwärtig aus der Lebens- und Entwickelungsgeschichte der Distomen wissen, noch nicht aus; auf das, was uns hierzu meines Erachtens zu wissen noch nötig ist, werde ich in der ausführlicheren und von Abbildungen begleiteten Darstellung meiner bisherigen Beobachtungen näher einzugehen haben. Das, was ich hier kurz zusammengefaßt habe, gründet sich auf einen sorgfältigen mikroskopischen und großenteils auch mikrometrischen Vergleich von zusammen über 800 Individuen der verschiedenen Arten [1]).

Cairo, August 1902.

---

1) Zu den hier beschriebenen Arten kommt noch hinzu: *Cotylogonimus persicus* M. Brn. 1901, der im Darm des persischen Wolfes lebt. M. Br.

Die Morphologie der Blastomyceten im Organismus in Bezug auf die Antikörper des Blutserums.

[Aus dem Hygienischen Institut der Kgl. Universität Cagliari.]

Forschungen von Prof. **Francesco Sanfelice.**

Den zahlreichen in den letzten Jahren stattgefundenen Forschungen über die pathogene Wirkung der Blastomyceten verdanken wir eine genaue Kenntnis der Form, welche dieselben in den Geweben der Versuchstiere und in den bösartigen Tumoren des Menschen zeigen.

Alle diese Formen lassen sich in zwei große Gruppen, in solche mit und in solche ohne Kapseln, einteilen. Bei der ersteren ist die verschiedene Gestalt der Kapsel und die abweichende Verteilung des protoplasmatischen Inhaltes ins Auge zu fassen; bei der zweiten betrachtet man nur die protoplasmatische Substanz, welche intensive Färbung annimmt.

Beschäftigen wir uns zuerst mit der Kapsel, so ist vor allem zu bemerken, daß dieselbe aus einer oder mehreren Membranen bestehen kann. Die innere, den Protoplasmakörper des Parasiten umschließende Membran erscheint in frischen Präparaten lichtbrechend und mehr oder weniger dick. Bei gefärbten Präparaten zeigt sie intensive Lichtbrechung und nimmt Teerfarben in großer Menge an. Hie und da befindet sich an der Außenseite dieser Zellhaut noch eine andere, mehr oder weniger dicke, hyaline Membran, die nur ein Sekretionsprodukt der inneren lichtbrechenden Membran ist. Bei Blastomyceten, welche bloß mit der inneren Membran versehen sind, kann die hyaline Haut mit Leichtigkeit zum Vorschein gebracht werden, indem man schwache Mineralsäurelösungen zusetzt; daher sieht man sie beständig auf solchen Blastomyceten, die mit sauer reagierenden Flüssigkeiten in Berührung kommen. Dieser Vorgang von Neubildung einer hyalinen aus der stark lichtbrechenden Membran läßt sich unter dem Mikroskop verfolgen, indem man einem in Glycerin zerfaserten Stückchen Niere eines durch Impfung mit pathogenen Blastomyceten gestorbenen Meerschweinchens einen Tropfen Salzsäure (oder auch Essigsäure) zufügt. Sowie die Säure zu wirken anfängt, erscheint nach und nach auf der Außenseite der Haut ein hyaliner Hof, der zusehends anwächst, während jene in gleichem Maße immer dünner wird.

In der dicken hyalinen Membran finden hie und da eine, zwei oder mehrere Verdichtungen von stark lichtbrechender Natur statt, ganz ähnlich der Substanz, aus welcher die innere Membran besteht. Es ist dies der Ursprung jener aus konzentrischen Ringen gebildeten Blastomycetenform, welche von Soudakewitsch beschrieben wurde und die ich experimentell im Kamm und Koller von Hühnern, sowie auf anderen Tieren durch Inokulation von Reinkulturen des Saccharomyces neoformans reproduziert habe.

Zur Formation der äußeren hyalinen Membran auf Unkosten der inneren büßt letztere den größten Teil ihrer Dicke ein und verschwindet oft ganz und gar.

Finden sich bei der Sektion an endovenöser Impfung mit pathogenen Blastomyceten gestorbener Tiere in den Harnkanälen der Nieren Parasiten,

so zeigen diese stets eine sehr dicke hyaline Membran, was sich aus der Einwirkung des sauren Harns erklärt.

Der protoplasmatische Inhalt der eingekapselten Blastomyceten fehlt entweder ganz (degenerierte, involutive Formen), oder er findet sich nur spärlich und gleichmäßig im ganzen Körper des Parasiten verteilt, oft zeigt er sich in Gestalt eines oder mehrerer Körnchen verschiedener Größe oder peripherischer Segmente, die an der inneren Membran anhaften, oder endlich bildet er eine gleichförmige, intensiv gefärbte Masse. Im letzten Falle verschmilzt der stark gefärbte plasmatische Inhalt für das Auge mit der lichtbrechenden Membran, welche die Teerfarben ebenso intensiv färbten, wie jenen.

Ganz die gleiche Erscheinung zeigt der protoplasmatische Inhalt der Blastomycetenformen ohne Kapsel.

Sowohl die Blastomyceten mit als auch ohne Kapseln können endocellular und frei, isoliert oder gruppenweise vorkommen. Nicht selten begegnet man im Innern einer Epithelzelle einem oder mehreren Parasiten (multiple endocelluläre Infektion Soudakewitsch) mit oder ohne Kapsel, mit oder ohne im Protoplasma der epithelialen Zelle ausgehöhlter Nische. Diese endocellulären Formen lassen sich nach meinen Methoden färben, während die von degenerativen Prozessen des Zellplasmas herrührenden Formen die Farbe nie annehmen.

Die freien Blastomycetenformen, mit oder ohne Kapsel, mag ihr Protoplasma homogen sein oder nicht, verteilen sich in den Geweben auf verschiedene Weise, wie ich schon in meinen früheren Arbeiten auseinandergesetzt habe. Doch will ich an dieser Stelle bemerken, daß schon vor einigen Jahren Russell den endocellulären oder freien Blastomyceten, mit intensiv und homogen färbbarem Protoplasma, sie mögen die hyaline Membran besitzen oder nicht, den Namen „Fuchsinkörperchen“ gegeben hat.

Diese Fuchsinkörperchen, die Russell fast immer in Carcinomen fand, zeichnen sich, wenn sie in freiem Zustande in den Geweben auftreten, durch eine ganz eigentümliche Anordnung aus. Man findet sie in mehr oder weniger zahlreiche Gruppen verteilt, die ihrerseits wieder aus einer mehr oder weniger großen Anzahl von Elementen von gleicher oder verschiedener Größe bestehen und sehr lebhaft gefärbt sind. Meistens treten auch die im Innern der Zellen gefundenen Körperchen zahlreich und von gleicher Größe, bald mit, bald ohne Hyalinmembran auf. Die Fuchsinkörperchen sind 4—12 μ groß und vereinigen sich zu Gruppen von 22 und noch mehr.

Russell betrachtete sie als Parasiten und stellte sie ganz richtig zu den Blastomyceten, doch unterließ er es, für seine Behauptungen den Beweis zu erbringen. In einer vor wenig Jahren veröffentlichten Arbeit [1]) erstattete ich ausführlichen Bericht über alle diesen Gegenstand behandelnden Publikationen und bewies, daß durch Impfen von Katzen mit Reinkulturen pathogener Blastomyceten die typischen Russell'schen Körperchen hervorgebracht werden. In einer anderen Arbeit zeigte ich sodann, daß auch in Hunden einige Zeit nach der Inokulation von Reinkulturen des Saccharomyces neoformans die neugebildeten Gewebe, außer Blastomyceten von gewöhnlichem Aussehen auch Fuchsinkörperchen enthalten.

---

1) Sanfelice, Ueber die experimentelle Erzeugung der Russell'schen Fuchsinkörperchen. (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Bd. XXIII. 1898.)

Ich hatte dargethan, daß durch das Impfen von Blastomycetenreinkulturen in den Bauch von Katzen beständig typische Fuchsinkörperchen, namentlich in der Milz, den Lymphdrüsen und im Knochenmark erzeugt wurden, während ich dieselben in den Geweben normaler Katzen nie gefunden hatte. Trotzdem beharren einige Forscher auch in ihren neuesten Arbeiten auf der Behauptung, die Russell'schen Körperchen seien das Produkt einer Zelldegeneration und haben nichts mit der Genesis bösartiger Tumoren zu schaffen.

Nicht wenig trugen zur Bestärkung der gegnerischen Ansicht die Forschungen Gonnella's und Guarnieri's bei, welche den Körperchen Russell's bei der trachomatösen Conjunctivitis begegneten, ebenso wie De Simoni sie in den hypertropischen Mandeln, Mazza stets bei Rhinoscleroma, Secchi bei der Acne cheloide, und andere Beobachter sie in anderweitigen pathologischen Geweben fanden. In meiner oben erwähnten Arbeit hatte ich eine Thatsache festgestellt, welche aus stattgefundenen Impfversuchen mit Reinkulturen pathogener Blastomyceten in der Bauchhöhle von Katzen als Endresultat hervorgegangen war; doch blieb mir selbst die Ursache dieses Faktums noch ein Rätsel. Eine gewisse logische Berechtigung war den Widersachern daher nicht abzusprechen, wenn sie an der Qualifizierung der Fuchsinkörper als cellulares (mucöses, pseudomucöses, amyloides, albuminöses etc.) Degenerationsprodukt, oder als Folge von Veränderungen des Nucleus (Hyperchromatolyse, Karyolyse, Karyogenese, Metachromasie) unentwegt festhielten.

Während sie aber fortfuhren, auf dieser Behauptung zu beharren — freilich ohne sie durch genaue Daten zu erhärten — setzte ich meinerseits eine Reihe zahlreicher Versuche fort, um den Grund zu finden, warum die auf Tiere geimpften Blastomyceten bisweilen die typische Form Russell'scher Körperchen annehmen? Nach langem Suchen und vieler Mühe ist es mir endlich gelungen, dazuthun, wie ich schon in einer früheren Arbeit andeutete, daß die Ursache der Transformation in den speziellen Eigenschaften des Blutserums der geimpften Tiere liegt, was ich mir vornehme, in diesem Berichte klarzustellen.

Injizierte ich in die Venen von Katzen das Blutserum durch Blastomycetenproteïne immunisierter Hunde und gleichzeitig virulente Kulturen pathogener Blastomyceten, so machte ich die Wahrnehmung, daß zwischen den nun im Gewebe auftretenden Parasiten und denjenigen, welche man nach endovenöser Injektion pathogener Blastomyceten allein beobachtet, ein morphologischer Unterschied bestehe.

In den letzten Jahren gelang es mir, ein paar große Hunde gegen die endovenöse Impfung mit virulenten Kulturen des Saccharomyces neoformans zu immunisieren, ebenso gegen den isolierten pathogenen Blastomyceten Plimmer's (welchem ich diese Sendung verdanke).

Das Gelingen dieser Operation bietet keine Schwierigkeiten, wenn man den Hunden im Laufe einiger Monate mehrmals subkutane oder abdominale Injektionen der blastomycetischen Proteine appliziert. Von der Herstellung der letzteren spreche ich in einer weiteren Abhandlung

Werden so behandelte Hunde der endovenösen Impfung mit virulenten Kulturen pathogener Blastomyceten unterzogen, so tritt keinerlei abnorme Erscheinung auf.

Doch vermag das Blutserum dieser Hunde, selbst in beträchtlicher Menge — gleichzeitig mit endovenöser Injektion des Saccharomyces neoformans oder des Plimmer'schen isolierten Blastomyceten — auf Katzen übertragen, diese Tiere nicht vom Tode zu retten.

Die Jugularinjektion von Blutserum immunisierter Hunde, zugleich mit Kulturen pathogener Blastomyceten, wurde an 10 Katzen vorgenommen. Zwei davon starben nach anderthalb Monaten, von den übrigen je eine nach 1 Monat, nach 25, 24, 20, 17, 16 und 10 Tagen.

Der anatomisch-pathologische Befund wich in keiner Hinsicht von demjenigen endovenös, bloss mit Kulturen pathogener Blastomyceten geimpfter Katzen ab, welchen ich in früheren Arbeiten beschrieben habe. Verschieden ist einzig und allein die Morphologie der Parasiten. Bei der endovenösen Impfung mit pathogenen Blastomyceten allein erscheinen diese gewöhnlich als eingekapselte Form, meistens mit granulösem Inhalt (während solche mit homogenem, intensiv färbbarem Plasma nur sehr selten vorkommen). Dagegen trifft man in Katzen, die gleichzeitig mit Blutserum immunisierter Hunde und pathogenen Blastomyceten in die Vene geimpft wurden, in der Regel nur sehr wenige Parasiten mit Kapseln und nicht homogenem, dagegen in großer Anzahl solche mit homogenem, intensiv färbbarem Inhalt, mit und ohne Kapsel, sowie jene Form, die sich in der typischen Gestalt von Fuchsinkörperchen präsentiert. Letztere fand ich niemals, wie ich hier ausdrücklich bemerken will, in den Geweben von allein nach endovenöser Injektion von pathogenen Blastomyceten gestorbenen Katzen. Wie schon früher gesagt, hatte ich nur bei solchen Tieren, die mit Kulturen des Saccharomyces neoformans in die Bauchhöhle geimpft wurden und mehrere Monate darauf gestorben waren, in den Lymphdrüsen, im Knochenmark und in der Milz das Vorhandensein von Fuchsinkörperchen konstatiert.

Der Einfluß, welchen das Blutserum immunisierter Hunde auf die in den Organen der Katzen vorhandenen Blastomyceten ausübt, ist ein indirekter; in dem Sinne, daß das Serum auf die Zellen einwirkt und sie reizt, eine ihre Gestalt verändernde Substanz hervorzubringen; und kein direkter. Denn bringt man Blastomyceten aus den Geweben von Katzen, die nur nach endovenöser Injektion pathogener Blastomyceten gestorben sind, in das Blutserum immunisierter Hunde, so geht auch nach mehreren Tagen keine Veränderung in der Gestalt der Parasiten vor sich.

Formveränderte Parasiten unterscheidet man leicht von den gewöhnlichen, indem die ersteren die Chromatolyse zeigen und ihr Inhalt homogen und meistens intensiv gefärbt erscheint; dabei durchlaufen sie alle Uebergangsstadien von der gewöhnlichen bis zur typischen Form der Fuchsinkörperchen. Die große Anzahl, in welcher diese Formen in Geweben, besonders der hämatopoetischen Organe vorkommen, erklärt mit überzeugender Leichtigkeit die Entstehungsart der Russell'schen Körperchen.

Die Parasiten von veränderter Gestalt treten im Knochenmark, in der Milz, in den Lymphdrüsen massenhaft auf, sind aber auch in den Nieren, der Leber und den Lungen nicht selten.

Das Phänomen der Transformation von Blastomyceten in Fuchsinkörperchen ist vollkommen identisch mit dem Vorgang, den man an gewissen Bakterien wahrgenommen und als Bakteriolyse bezeichnet hat; es ist deshalb nur gerecht, dasselbe „Saccharomykolyse“ oder „Blastomycetolyse“ zu taufen.

Eine Substanz, welche derartige Umwandlungen hervorzubringen vermag — wie die im Blutserum gegen Blastomyceten immunisierter Tiere enthaltene — muß der agglutinanten, der bakteriociden etc. Substanz der Klasse der Antikörper angereiht werden.

Findet man in Katzen, die einige Monate nach der Abdominal-

inokulation pathogener Blastomyceten starben, ausschließlich Fuchsinkörperchen, so will das bedeuten, daß einige abgestorbene Parasiten mit ihren Proteinen eine Reaktion von seiten des Blutserums und Bildung der saccharomykolytischen Substanz hervorgerufen haben, die ihrerseits wieder den Rest der Parasiten in Fuchsinkörperchen umwandelte.

Man trifft in den Geweben an blastomycetischer Infektion gestorbener Tiere neben Parasiten von normalem Aussehen auch solche, die ihren ganzen chromatischen Inhalt verloren haben und auf nichts als die hyaline Membran reduziert sind. Meiner Ansicht nach handelt es sich um abgestorbene Parasiten, und es gab ihr vom Organismus absorbierter Inhalt Anlaß zur Bildung von Antikörpern und unter diesen auch der saccharomykolytischen Substanz.

Wie läßt sich nun eine solche Wirkung der genannten Substanz auf die Blastomyceten erklären?

Vor allem müssen wir eine Aktion der saccharomykolytischen Substanz auf die Kapsel der Blastomyceten annehmen, die sich von selbst aus der von der hyalinen Membran erlangten Eigenschaft ergiebt, sich mit künstlichem Farbstoff vollzusaugen, und zwar in solchem Maße, daß man sie nicht mehr deutlich von der inneren lichtbrechenden Zellhaut unterscheiden kann.

In zweiter Linie sehen wir eine Einwirkung der saccharomykolytischen Substanz auf den protoplasmatischen Inhalt, wie aus der Bildung der Chromatolyse, d. h. aus dem Schmelzen der chromatischen Substanz und ihrer homogenen Verteilung über den ganzen Parasitenkörper hervorgeht. Drittens findet eine Fusion der chromatischen Substanz mit der Kapsel statt, so daß sie nicht mehr von der Membran der letzteren zu unterscheiden ist und dadurch das typische Aussehen von Fuchsinkörperchen annimmt.

Diese Körperchen befinden sich nun im metachromatischen Stadium, insofern als sie mit Gentianviolett eine von den normalen Parasiten etwas verschiedene Färbung annehmen.

Nachdem nun die Veränderung der Kapsel, dann die Chromatolyse der chromatischen Substanz des Parasitenleibes und seine Verschmelzung mit der Kapsel stattgefunden hatte, beginnt endlich die Fragmentierung dieser chromatischen Massen, ähnlich einem Gemmationsprozeß, insofern als von der Peripherie einer großen chromatischen Hauptmasse sich kleinere ablösen und entweder eine Zeit lang an jener adhärieren oder losgetrennt von den Cellularelementen genommen werden. So erklären sich mit Leichtigkeit alle die verschiedenen Formen, unter welchen die Fuchsinkörperchen sich in den Geweben zeigen.

Sämtliche Erscheinungsphasen der Blastomyceten während der Saccharomykolyse stimmen vollkommen mit denen der Gewebszellkerne bei einigen pathologischen Prozessen überein.

Uebrigens wäre noch ein anderer Verlauf der Bildung Russellscher Körperchen denkbar; man könnte nämlich annehmen, daß nach Veränderung der Membran des Parasiten durch saccharomykolytische Substanz und stattgefundener Chromatolyse seines Plasmas die plasmatische Substanz nach und nach durch die modifizierte Membran durchsickere und so die Entstehung der typischen Fuchsinkörperchen veranlasse.

Die Zulässigkeit dieser zweiten Hypothese hängt nun ganz von der Frage ab, ob in den Geweben eine große Anzahl ihres Inhalts beraubter Blastomycetenkapseln auftreten. Dies ist aber nicht der Fall, und halte ich daher den zuerst beschriebenen Entstehungsmechanismus der Russell'schen Körperchen für wahrscheinlicher als diesen zweiten.

Da es zur Stunde noch an Mitteln gebricht, die im Blutserum vorhandene saccharomykolytische Substanz zu isolieren, so ist uns ein eingehendes Studium des Phänomens der Fuchsinkörperbildung leider noch versagt. Begnügen wir uns daher mit den auf beobachtete Thatsachen begründeten Hypothesen.

So viel geht aus oben Gesagtem, sowie aus dem, was ich in der Folge noch beifügen werde, klar hervor, daß die Fuchsinkörperchen keine lebenden Blastomyceten, und daß die ihnen eigentümlichen Reproduktionsformen weiter nichts als ein falsches Knospen sind. Die negativen Resultate aller meiner Versuche, aus dem Knochenmark, der Milz und den Lymphdrüsen der durch gleichzeitige Inokulation von Serum immunisierter Hunde und pathogener Blastomyceten gestorbenen Katzen Kulturen zu ziehen, erhalten dadurch ihre natürliche Erklärung. Ich glaubte anfänglich, es möchte sich um Blastomycetenformen handeln, welche ausschließlich im Organismus leben und nicht auf künstlichen Nährböden fortzukommen vermögen. Doch gelangte ich in den letzten Jahren zu der Ueberzeugung, daß ihnen die Reproduktivität überhaupt, sei es auf Nährböden, als auch im Organismus, abgeht. In der That habe ich nie abnorme Veränderungen an Katzen, Hunden, Meerschweinchen und Kaninchen wahrgenommen, welchen ich mit sterilem Wasser bereitete und ausschließlich typische Fuchsinkörperchen enthaltende Emulsionen von Milz und Knochenmark von Katzen, die an endovenöser Einführung von Serum immuner Hunde und pathogenen Blastomyceten gestorben waren, in die Venen injiziert hatte.

Damit ist jedoch nicht gesagt, daß den Russell'schen Körperchen, wenn sie sich einmal im tierischen Organismus entwickelt haben, keinerlei Einfluß auf die sie umgebenden Cellularelemente oder auf den Organismus im allgemeinen zuzumuten sei. Denn sicherlich handelt es sich um ein dem Organismus fremdes Protoplasma, welches, allmählich absorbiert, zum mindesten eine giftige Wirkung ausüben könnte. Diese Thatsache gründlich zu erforschen, ist bereits eine Serie von Untersuchungen im Gange, die ich demnächst dem Druck übergeben werde. Ich versuche damit die aktive Wirksamkeit der Fuchsinkörperchen im Organismus darzuthun. Thatsache ist, daß Katzen, in deren Geweben der Sektionsbefund nur Fuchsinkörperchen aufwies, eine beträchtliche Abmagerung, ja eine wirkliche Kachexie zeigten, ganz wie die Tiere, in deren Geweben auch Blastomyceten gewöhnlicher Form neben den Fuchsinkörperchen gefunden wurden.

Ferner war es von Wichtigkeit, zu wissen, ob im Blutserum normaler Hunde die saccharomykolytische Substanz vorhanden sei oder nicht. Zu diesem Zwecke nahm ich an Katzen eine Reihe endovenöser Injektionen des Serums dieser Hunde gleichzeitig mit Kulturen des Saccharomyces neoformans und der isolierten pathogenen Blastomyceten Plimmer's vor.

Im ganzen wurden 8 Katzen mit ebenso vielen Sera 8 normaler Hunde geimpft. Die Katzen starben nach 6, 8, 11, 12, 15, 20, 23 und 25 Tagen. Der Sektionsbefund der ersten 5 nach 6—8—11—12—15 Tagen gestorbenen Katzen wies in allen Organen zahlreiche Blastomyceten in Saccharomykolyse und ebenso viele Russell'sche Körperchen auf; die nach 20—23—25 Tagen gestorbenen Katzen ergaben Blastomyceten von gewöhnlichem Aussehen, dagegen keine Blastomyceten in Saccharomykolyse noch Fuchsinkörperchen.

Aus diesen Untersuchungen geht hervor, daß das Blutserum einiger

normaler Hunde die saccharomykolytische Substanz, welche die Blastomyceten in Russell'sche Körperchen verwandeln kann, wirklich enthält.

Wie verhalten sich nun die Hunde, deren Blut die saccharomykolytische Substanz führt, gegen die Inokulation pathogener Blastomyceten? Und kommen in den Geweben solcher Hunde Fuchsinkörperchen vor oder nicht? Beide Fragen bieten hohes Interesse für unser Studium. Wir wissen, daß auch der gesunde Organismus auf den Schleimhäuten zahlreiche Blastomyceten beherbergt und hierauf bezügliche Untersuchungen wiesen deren Vorkommen auf der Schleimhaut der Mundhöhle, der Eingeweide und der Conjunctiva nach, sowie daß sie auch auf der Cutis gefunden werden. Gelingt es diesen Parasiten nun, an verletzten Stellen der Schleimhäute oder der äußeren Haut in die Gewebe einzudringen und nach ihrem Absterben im Blutserum die Bildung saccharomykolytischer Substanz hervorzurufen, so kann die letztere die noch lebenden Blastomyceten in Fuchsinkörperchen verwandeln.

Der Nachweis von Fuchsinkörperchen in den Geweben von Hunden, deren Blut die saccharomykolytische Substanz enthält, einerseits, und das Studium der Art und Weise, wie solche Tiere gegen die Einführung pathogener Blastomyceten reagieren, andererseits, bilden den Gegenstand meiner nächsten Untersuchungen. Gewiß ein neues und hochinteressantes Feld für unsere Forschung!

Es ist bereits bekannt, daß pathologische Gewebe des Menschen, die von den bösartigen Tumoren verschieden sind, die Gegenwart von Fuchsinkörperchen aufweisen. Doch so lange nicht durch rigoröse eingehende Untersuchungen der Beweis erbracht wird, daß durch Injektion von Blastomycetenreinkulturen ähnliche anatomisch-pathologische Veränderungen erzeugt werden können, fehlt uns die Berechtigung, jene Fuchsinkörperchen als direkte Ursache der Veränderung verantwortlich zu machen. Wir können nur annehmen, daß es sich um jene zufälligen Bewohner der Schleimhäute und der Cutis handelt, die, ins Innere der Gewebe vorgedrungen, den Antikörper hervorgebracht haben und dadurch in Fuchsinkörperchen umgestaltet worden sind.

Ebenso bleibt, laut einer Reihe von Untersuchungen, von der weiter unten die Rede sein wird, die Möglichkeit offen, daß auch in normalen Geweben Fuchsinkörperchen vorkommen können. Stets sind die gleichen Parasiten der Cutis und der Schleimhäute im Spiel, welchen Epitheldiskontinuitäten erlaubten, in das Innere der Gewebe vorzudringen, wo sie sich in Fuchsinkörperchen verwandeln können.

In die Venen von Katzen injizierte ich gleichzeitig mit Kulturen pathogener Blastomyceten die Sera verschiedener Tiere, um zu sehen, ob diese die saccharomykolytische Substanz enthielten. Diese war jedoch weder im Blutserum normaler Pferde noch in dem von Schweinen, Schafen, Kaninchen und Enten anzutreffen; denn der Befund der Parasiten unterschied sich in nichts von dem bei Katzen konstatierten, die an der Impfung mit den Blastomyceten gestorben waren.

Eine zweite Serie von Versuchen wurde an Hunden vorgenommen. Ich spritzte in ihre Venen die Sera von Hunden und Katzen, die mittels Blastomycetenproteïnen gegen endovenöse Einführung pathogener Blastomycetenkulturen immunisiert waren, gleichzeitig mit den Saccharomyces neoformans oder Plimmer's isolierten pathogenen Blastomyceten.

Bei allen Hunden, welche der endovenösen Injektion des Blutserums

immunisierter Hunde und pathogener Blastomyceten erlagen, fanden sich nach dem Tode saccharomykolytische Parasiten in beträchtlicher Menge vor, während die Fuchsinkörperchen in Milz, Lymphdrüsen und Knochenmark weder so beständig noch so zahlreich auftraten wie bei den Katzen.

Ganz dasselbe war der Fall bei Hunden, die an endovenöser gleichzeitiger Impfung mit dem Serum mittels Proteïnen des Saccharomyces neoformans oder der Blastomyceten Plimmer's immunisierter Katzen und den Kulturen der gleichen pathogenen Parasiten zu Grunde gegangen waren.

Dagegen begegnete ich in den Geweben an endovenöser Injektion des Serums normaler Hunde und Katzen und pathogener Blastomyceten gestorbener Hunde weder Parasitenformen in Saccharomykolyse noch typischen Fuchsinkörperchen.

In die Venen einiger Hunde spritzte ich in sterilisiertem Wasser emulsionierte Milz- und Knochenmarkteile von Katzen, deren Sektionsbefund lediglich Fuchsinkörperchen aufwies und die nach der endovenösen Einführung von Hundeserum und Saccharomyces neoformans gestorben waren; der Versuch gab keinerlei positive Resultate. Die Tiere zeigten nichts Abnormes und befinden sich zum Teil heute noch unter Beobachtung. Der Fall wird in einer späteren Arbeit wieder zur Sprache kommen, da ich, wie schon bemerkt, beabsichtige, nach dem Schicksal der Fuchsinkörperchen im Organismus zu forschen.

Zu der dritten Reihe von Versuchen verwendete ich das Blutserum mit den Proteïnen des Saccharomyces neoformans und des pathogenen Blastomyceten Plimmer's behandelter Hunde, Meerschweinchen und Kaninchen. Ich injizierte diese Sera gleichzeitig mit den genannten pathogenen Parasiten in die Venen von Kaninchen und Meerschweinchen.

Die nach solcher Behandlung gestorbenen Kaninchen zeigten in ihren Geweben niemals Blastomycetenformen in Saccharomykolyse und ebensowenig Fuchsinkörperchen.

Dagegen beobachtete ich in den Geweben der Meerschweinchen, welche nach endovenöser Injektion der Sera mit den Proteïnen der pathogenen Blastomyceten behandelter Hunde resp. Meerschweinchen und pathogener Parasiten gestorben waren, wohl zahlreiche Blastomycetenformen von homogen und intensiv gefärbtem Inhalt, aber keine typischen Fuchsinkörperchen. In der Milz, dem Knochenmark und den Lymphdrüsen dieser Meerschweinchen zeigten sich viele endocellulare Parasiten mit intensiv und homogen gefärbtem Inhalt. Eine solche Menge endocellularer Parasiten von dieser Spezialform habe ich in den Geweben nur mit pathogenen Blastomyceten geimpfter Meerschweinchen niemals angetroffen.

Zur Erklärung aller dieser Formverschiedenheiten unter den Parasiten, welche in den Geweben gleichzeitig mit Blutserum immunisierter Tiere und pathogenen Blastomyceten geimpfter Versuchstiere beobachtet werden, sind ganz gewiß noch viele andere Untersuchungen erforderlich, über die ich seiner Zeit Bericht erstatten werde.

Nachdem sowohl im Blutserum von Tieren, die mit den Proteïnen der pathogenen Blastomyceten behandelt wurden, als in dem einiger normaler Tiere die Existenz eines Antikörpers, der die Parasiten in

typische Fuchsinkörperchen umzuwandeln vermag, thatsächlich festgestellt war, trat die Notwendigkeit in den Vordergrund, zu erforschen, ob derselbe Antikörper sich auch dann im Serum bildet, wenn die Tiere mit den Proteïnen der nicht pathogenen Blastomyceten geimpft werden.

Zu diesen Versuchen wurden Kulturen nicht pathogener, von der Luft abgeschlossener Blastomyceten verwendet und die Proteïne derselben im Laufe von 2, 3 und mehr Monaten wiederholt in das subkutane Bindegewebe von Hunden gespritzt. Das Blutserum, welches diesen Tieren abgezapft wurde, diente zuerst gleichzeitig mit dem Blastomyceten, dessen Proteïne zur subkutanen Injektion der Hunde benutzt worden waren, zu endovenöser Impfung von Katzen.

Nach Ablauf von 10, 15, 20 und mehr Tagen wurden die Katzen getötet und aus allen ihren Organen Präparate hergestellt, wobei meine gewöhnlichen Methoden der Doppelfärbung in Anwendung kamen. Auf den Schnitten sämtlicher Organe dieser Katzen kamen stets zahlreiche Fuchsinkörper zum Vorschein; besonders häufig in der Milz, dem Knochenmark, den Lymphdrüsen, spärlicher in den Nieren, den Lungen und der Leber. Keine der zahllosen Sektionen, die ich an Organen normaler Katzen ausgeführt habe, zeigte jemals eine derartige Fülle von Fuchsinkörperchen.

Weist der Befund der frischen Organe von Katzen das Vorhandensein der Fuchsinkörperchen auf, die an ihrer runden Gestalt, an der starken, fetttropfenähnlichen Lichtbrechung und an ihrer gruppenweisen, freien oder endocellularen Disposition leicht erkennbar sind, so geben die Kulturen stets ein negatives Resultat. Zeigen sich dagegen neben den Fuchsinkörperchen auch gewöhnlich aussehende Blastomyceten, so erhält man positive Kulturresultate.

Auf die Ergebnisse dieser Experimente gestützt, darf somit die Behauptung aufgestellt werden, daß nicht nur die Proteïne pathogener, sondern auch die der nicht pathogenen Blastomyceten die Bildung eines Antikörpers im Blutserum veranlassen können, welcher die Saccharomykolyse resp. Blastomykolyse zu erzeugen vermag, indem die Parasiten sich in Fuchsinkörperchen verwandeln.

Doch handelt es sich nicht um eine Präexistenz dieses die Saccharomykolyse hervorrufenden Antikörpers im Blutserum der mit den Proteïnen nichtpathogener Blastomyceten behandelten Hunde, da mit solchem Serum in vitro in Berührung gebrachte Blastomyceten keine Formveränderung zeigen. Vielmehr enthält das Serum so behandelter Hunde nur gewisse Substanzen, welche, Katzen injiziert, auf die Cellularelemente derselben einen solchen Reiz auszuüben vermögen, daß von den Zellen selbst der die Blastomyceten in Fuchsinkörperchen verwandelnde Antikörper erzeugt wird.

Auch bei Hunden, welche eine Jugularinjektion von Serum mit den Proteïnen nicht pathogener Blastomyceten behandelter Hunde und den Kulturen derselben Parasiten erhalten hatten und einige Tage später getötet worden waren, finden sich besonders zahlreich in den hämatopoetischen Organen die Fuchsinkörperchen vor.

Nur bei Meerschweinchen und Kaninchen gelang es mir nie, das Vorkommen dieser Körperchen als Folge gleichzeitiger endovenöser Impfung mit nicht pathogenen Blastomyceten und Serum mit den Proteïnen derselben Parasiten behandelter Hunde zu konstatieren.

Selbst wenn Kaninchen der endovenösen Injektion der Sera mit den gleichen Proteïnen behandelter Kaninchen und Meerschweinchen

unterzogen wurden, konnte ich in den Geweben keine typischen Fuchsinkörperchen erblicken.

Zur Stunde bin ich nicht in der Lage, für diese Thatsache irgendwelche Erklärung zu geben und hoffe nur, mittels späterer Untersuchungen die Frage zu erledigen.

Ich habe bereits vorausgeschickt, daß das Auffinden von Blastomyceten unter der Form von Fuchsinkörperchen in einem pathologischen Gewebe nicht dazu berechtigt, dieselben als Ursache des pathologischen Prozesses zu betrachten, da ihr Erscheinen ganz zufällig sein, d. h. von ihrem ständigen Aufenthalt an der Oberfläche der Cutis oder der Schleimhäute herrühren kann, von wo sie in die Gewebe eingedrungen sind. Die Wertlosigkeit jener Arbeiten, welche auf das bloße mikroskopische Examen hin die Blastomyceten als Urheber der pathologischen Prozesse darstellen, ist damit hinlänglich bewiesen. Es ist durchaus unerläßlich, auf die mikroskopische Untersuchung ein praktisches Experiment folgen zu lassen, indem man durch Inokulation von Blastomycetenreinkulturen die histologische Veränderung reproduziert, bei welcher die Fuchsinkörperchen gefunden wurden.

Nun kommen in den bösartigen Tumoren mit langsamem Verlauf die Blastomyceten stets unter der Form von Fuchsinkörperchen vor und es erklärt sich hieraus die Unmöglichkeit, in solchen Fällen Kulturen der Parasiten zu erhalten. Nur bei jenen malignen Tumoren des Menschen, wo die saccharomykolytische Substanz des Blutserums noch nicht alle Parasiten in Fuchsinkörperchen verwandelt hat, ist die Möglichkeit vorhanden, die Kulturen hervorzubringen.

Die Zeitdauer, welche die Umwandlung der Blastomyceten in Fuchsinkörperchen in den Versuchstieren in Anspruch nimmt, ist großen Schwankungen unterworfen, da sie von der Art und Weise der Reaktion abhängt, die der Organismus bei der Bildung der Antikörper im Blutserum ausübt.

Es wäre daher nicht zu verwundern, wenn man in einem lange andauernden Tumor des Menschen noch kultivierbare Blastomyceten fände, und ebensowenig, daß man sie in einem Tumor von ziemlich raschem Verlauf nicht kultivieren könnte.

Treffen wir in bösartigen Tumoren des Menschen ausschließlich Fuchsinkörperchen und betrachten wir dieselben als Ursache der Veränderung, so geschieht dies, weil durchaus zuverlässige Forscher (Plimmer-Leopold) aus den Carcinomen des Menschen Reinkulturen von Blastomyceten erhalten haben, und weil andererseits mit Reinkulturen pathogener Blastomyceten auf Hunden epitheliale Tumoren erzeugt worden sind (Sanfelice).

Aus den oben angeführten Gründen finden daher die von Koch zur Qualifizierung eines Parasiten als Ursache einer gewissen Infektion aufgestellten Kriterien keine Anwendung auf die von pathogenen Blastomyceten hervorgerufenen anatomisch-pathologischen Veränderungen.

Vor allem ist das beständige Vorkommen blastomycetischer Formen in der Gestalt von Fuchsinkörperchen kein Merkmal für die pathogene Eigenschaft eines Blastomyceten, da ihre Anwesenheit, wie wir oben gesehen, eine rein zufällige sein kann.

Ferner wissen wir, daß die in Form von Russell'schen Körperchen in den Geweben vorkommenden Blastomyceten nicht mehr kultivierbar sind; dieser Umstand, d. h. die Unmöglichkeit, Kulturen zu erhalten, ist daher kein Grund, ihnen die Urheberschaft eines gewissen pathologischen Prozesses abzusprechen.

Uebrigens sind andere, infektive, pathologische Prozesse bekannt, bei welchen dieselben Umstände auftreten. Beim Aussatz, bei der Aktinomykose, bei einigen Formen von Tuberkulose findet man in den Geweben unter dem Mikroskop die spezifischen Mikroorganismen; doch kann man sie nicht immer in Reinkulturen isolieren, und gelingt dies ausnahmsweise hier und da, so ist es doch nicht immer möglich, mit der Reinkultur den anatomisch-pathologischen Prozeß zu reproduzieren.

Die Art und Weise, wie in den Geweben die Blastomyceten ausarten und absterben, ist von der der Schizomyceten durchaus verschieden. Alle Beobachter, die sich mit dem Studium der Bakteriolyse — mit Bezug auf die Antikörper — beschäftigt haben, beschreiben die Umwandlung der Bakterien in Körnchen, kein einziger erwähnt die Bildung von Fuchsinkörperchen.

Auch ich nehme mir vor, die Bakteriolyse der bekanntesten pathogenen und nicht pathogenen Mikroorganismen zu studieren, um zu sehen, ob einer oder der andere Analogieen mit den Blastomyceten aufweist.

Aus dem Gesagten geht das Schicksal, das den auf den Organismus geimpften Blastomyceten bestimmt ist, klar hervor.

Unzweifelhaft wird ein Teil derselben durch die Nieren ausgeschieden. An endovenöser Injektion von Blastomyceten gestorbene Tiere weisen fast immer eine Menge derselben in den Glomerulis und Harnkanälchen auf. Sind sie in die Hälse der Glomeruli geraten, so brechen diese leicht ab und geben den Durchlaß in die Harnkanäle frei, wo sich eigentliche Blastomycetencylinder bilden. Untersuchungen, bei denen ein- oder zweimal während der Infektion Kulturversuche mit dem Harn vorgenommen und aus deren negativem Ausgange der Schluß gezogen wurde, die Parasiten würden nicht durch die Nieren ausgeschieden, sind somit absolut wertlos. Man hätte allen während der Infektion abgesonderten Harn sammeln, durch Centrifugieren entwässern und den Rückstand zu den Kulturen benützen müssen. Nur auf diese Art war die Frage zu lösen!

Von den im Organismus zurückbleibenden Blastomyceten stirbt ein Teil ab und veranlaßt mit den Proteinen die Reaktion des Blutserums, welches die Membran der toten Parasiten chemisch verändert und für die gewöhnlichen Hilfsmittel der Mikroskopie unsichtbar macht. Die lebenden Blastomyceten verwandelt das reaktive Serum in Fuchsinkörperchen und übt so zu gleicher Zeit eine saccharomykolytische und saccharomykocide Wirkung aus.

Die endocellularen und freien Fuchsinkörperchen dauern im Organismus lange aus, unzweifelhaft mit toxischer Wirkung, die in der Kachexie zum Ausdruck gelangt.

Daß die Fuchsinkörperchen sich auch nach langer Zeit noch in den Zellen vorfinden, ist ein Beweis dafür, daß der Phagocytismus keinen zerstörenden Einfluß auf sie hat. Von den cellularen Elementen werden sie als dem Organismus fremde Körper inglobuliert, gleich den Karmin- und Rußkörperchen.

Was endlich den Tod betrifft, dem, unabhängig von der Verwandlung in Fuchsinkörperchen, ein Teil der Blastomyceten verfällt, so muß ich folgendes bemerken: Außer dem Totalverlust aller chromatischen Substanz, wobei nichts als die Membran zurückbleibt, können sie auch der kalkichten Degeneration erliegen, wenn in der äußeren Membran sich ein Niederschlag von phosphorsaurem Kalk bildet; damit hat alles Leben des Protoplasmas ein Ende. Es ist indessen durchaus un-

wahr, daß man in den Nieren der Hunde, Katzen, Kaninchen und Meerschweinchen, die an endovenöser Inokulation pathogener Blastomyceten gestorben sind, mehr oder weniger große Kalkmassen findet, ein Produkt der kalkichten Degeneration, die Gruppen von Parasiten heimgesucht hätte.

Ueber Wirkungen der Hämolysine im Organismus.

Von Privatdocent Dr. **R. Kraus** und Dr. **C. Sternberg.**

Die Arbeiten über Hämolysine (Immunhämolysine, Bakteriohämolysine) haben sich bisher in der Richtung bewegt, die Wirkungen dieser Substanzen auf rote Blutkörperchen in vitro kennen zu lernen und den Mechanismus der Hämolyse klarzulegen. Wie sich diese Substanzen im Organismus verhalten, darüber liegen nur spärliche Angaben in der Litteratur vor.

Ueber Wirkungen der Immunhämolysine im Organismus finden sich Angaben in den Arbeiten von Belfanti und Carbone, Cantacuzène und Gruber vor.

Belfanti und Carbone (1) zeigten bereits im Jahre 1898, daß ein Pferdeserum, gewonnen von Pferden, die mit Kaninchenblut behandelt wurden, toxisch für Kaninchen wirke. In der Arbeit von Cantacuzène (2) wird zunächst gezeigt, daß Serum von Meerschweinchen, die mit Kaninchenblut behandelt wurden, in großen Dosen (15 ccm) intravenös Kaninchen injiziert, dieselben in $^1/_2$—1 Minute tötet. Nach intravenöser Injektion geringerer Mengen, 2—3 ccm, fand Cantacuzène bereits nach 1 Stunde Abnahme der roten Blutkörperchen bis auf 1 500 000, nach 36 Stunden auf 600 000, nach 48 Stunden auf 300 000 Blutkörperchen.

M. Gruber (3) beobachtete nach intraperitonealer Injektion von 4—10 ccm eines inaktivierten Immunhämolysins nach 8—12 Stunden Hämoglobinämie bei Meerschweinchen und ein Herabsinken der Zahl der roten Blutkörperchen von 5 Mill. auf 0,9—0,8 Mill.

Anschließend an die Mitteilung Gruber's berichtete einer von uns (Kraus [4]) in der Sitzung der Gesellschaft der Aerzte vom 22. Nov. 1901, daß nach Injektion relativ geringer Mengendes Kaninchenimmunserums ein schweres Krankheitsbild bei Hunden zu beobachten sei. 2—3 Tage nach der subkutanen Injektion tritt neben allgemeiner Schwäche Ataxie wie schwerer Ikterus bei den Hunden auf. Die Haut, die sichtbaren Schleimhäute waren intensiv gelb gefärbt. Die Untersuchung des Blutes in diesem Stadium ergab Hämoglobinämie, kernhaltige rote Blutkörperchen, starke Leukocytose. In diesem Krankheitsstadium tritt auch Hämaturie und Hämoglobinurie auf. Die Tiere gehen dann im Coma rasch zu Grunde. Dieselben Erscheinungen, wie sie eben beschrieben wurden, treten auch auf, wenn man bei 58° inaktiviertes Serum injiziert.

II.

Die folgenden Untersuchungen gehen von dieser Beobachtung aus und beschäftigen sich zunächst damit, den Einfluß größerer und kleinerer Mengen der Immunhämolysine auf den Organismus und die eintretenden

Blutveränderungen kennen zu lernen und gehen der Genese des Ikterus nach. (Die Untersuchungen wurden vorwiegend an Hunden mit verschiedenartigen Hämolysinen ausgeführt. Die Immunhämolysine wurden von Kaninchen durch Injektion defibrinierter Hundeblutkörperchen gewonnen. Das Serum wurde vor dem Versuche in vitro auf seinen hämolytischen und hämagglutinierenden Wert geprüft.)

Nachdem Belfanti und Carbone, Cantacuzène toxische Wirkungen mit Immunhämolysinen beobachtet haben, Cantacuzène sogar akuten Tod bei Kaninchen beschreibt, war es zunächst wichtig, in dieser Hinsicht das Immunhämolysin zu prüfen. Die diesbezüglichen 5 Versuche haben gezeigt, daß Dosen von 5—10 ccm eines Immunhämolysins, intravenös Hunden injiziert, einen akuten Tod, der innerhalb von 15—20 Minuten erfolgt, bedingen. Sofort nach der Injektion erbrechen die Hunde, werden ataktisch und fallen bewußtlos zusammen. Die Sensibilität, die peripheren Reflexe sind erloschen. Die Atmung ist unregelmäßig, verlangsamt. Ohne besondere Erscheinungen gehen die Hunde im Coma zu Grunde. Gleichzeitige Kontrollversuche haben ergeben, daß normales Kaninchenserum, in Mengen von 10 ccm intravenös Hunden injiziert, gut vertragen wird. Da die Obduktion der Hunde, die sofort vorgenommen wurde, keine pathologischen Veränderungen nachzuweisen imstande war, da Hämolyse durch die entsprechende Untersuchung auszuschließen war, müssen wir annehmen, daß der akute Tod nicht durch die Immunhämolysine des Serums zustande kommen dürfte. Dem Einwande, daß es möglicherweise zur Agglutination der roten Blutkörperchen im Organismus käme, da doch das Serum auch Hämagglutinine enthält, widersprechen die von uns bereits in der vorläufigen Mitteilung beschriebenen Beobachtungen. Wir fanden, daß die Agglutination der Blutkörperchen nach Injektion des Immunserums erst außerhalb des Organismus, nachdem das Blut einige Minuten extravaskulär gestanden hat, erfolge.

Der Nachweis dieser auffallenden Erscheinung wird in der Weise erbracht, daß das aus der Vene abfließende Blut in dünner Schicht auf Glasplatten aufgefangen wird. Das frische Blut bildet eine deckfarbene Schicht, so wie das eines gesunden Tieres. Erst nach einigen Minuten kommt es zur Klumpenbildung, gerade so, wie wenn agglutinierendes Serum zugesetzt worden wäre.

Diese Thatsache hat ihr Analogon in den Beobachtungen von Salimbeni, welcher gezeigt hatte, daß Bakterien im Organismus auch nicht agglutiniert werden, sondern erst außerhalb desselben.

Wir konnten auch nachweisen, daß das Agglutinin im Serum des betreffenden Tieres nicht nachzuweisen sei. Das Agglutinin dürfte demnach an die roten Blutkörperchen im Organismus gebunden werden, ohne daß diese zur Agglutination gebracht werden. Daß Bindung des Agglutinins erfolgen könne, ohne daß es zur Agglutination käme, ist uns seit den Versuchen von Joos eine geläufige Thatsache. Wodurch in unserem Falle die Ausfällung verhindert wird, konnten wir vor der Hand nicht entscheiden. Auch die histologische Untersuchung von Organen solcher Hunde ergab keine Anhaltspunkte für eine im Organismus erfolgte Agglutination der Blutkörperchen.

In den weiteren Versuchen wollen wir uns mit der Wirkung der Hämolysine im Organismus beschäftigen. Um die toxische akute Giftwirkung auszuschalten, wurden die Versuche mit geringeren Serummengen oder mit minderwertigem Immunserum angestellt.

Im folgenden sollen die Protokolle über die einzelnen Versuche

ausführlich wiedergegeben werden. Es wurde der klinische Verlauf der durch subkutane Injektion hervorgerufenen Krankheitsbilder genau verfolgt und der anatomische Befund makro- und mikroskopisch festgestellt. Die einzelnen Protokolle sind deswegen wiedergegeben, weil durch die verschiedenwertigen Hämolysine oder verschiedene Mengen desselben Hämolysins nicht das gleiche Krankheitsbild hervorgerufen werden konnte.

I. Versuch.

4. Sept. Subkutane Injektion von 10 ccm eines schwachen Immunhämolysins.

7. Sept. Nochmalige Injektion von 10 ccm.

8. Sept. Deutlicher Ikterus. Harn blutig. Dyspnoë. Hämoglobinämie. Im gefärbten Blutpräparate kernhaltige rote Blutkörperchen, Hyperleukocytose.

9. Sept. Exitus.

Die Obduktion ergab im wesentlichen folgenden Befund: Allgemeine Decken gelb, Skleren und sichtbare Schleimhäute gelb gefärbt. Herzfleisch ziemlich fest, im rechten Ventrikel braunrote Coagula, im linken Ventrikel teils flüssiges, lackfarbenes Blut, teils feste Coagula. Die Leber etwas vergrößert, von derber Konsistenz, am Durchschnitt dunkelrot. Die Gallenblase gefüllt. Milz vergrößert, dunkelrot, Pulpa etwas abstreifbar. Die Harnblase kontrahiert, enthält nur einige Tropfen blutig tingierten Harnes.

Bei histologischer Untersuchung zeigte die Leber [1]) eine beträchtliche Verschmälerung der Zellbalken in den centralen Anteilen der Acini, die Leberzellen daselbst von zahlreichen Lücken durchsetzt und daher nur schwach färbbar. Die Centralvenen und die angrenzenden Kapillaren erweitert, zeigen eine deutliche Hyperleukocytose. Die interacinösen Gallenwege waren mit Galle prall gefüllt.

Die Milz war sehr blutreich, die roten Blutkörperchen waren meist nur schwach färbbar und bildeten hier und da kleine Häufchen.

In der Niere fanden sich die Zeichen einer trüben Schwellung.

II. Versuch.

Erhielt in der Zeit vom 9.—30. Sept. wiederholt subkutane Injektionen eines schwachen Immunhämolysins, im ganzen 25 ccm.

Die Blutuntersuchung ergab am 18. Sept. einen normalen Befund; am 30. Sept. fanden sich zahlreiche kernhaltige, rote Blutkörperchen sowie eine beträchtliche Hyperleukocytose. Die Anämie steigerte sich in den beiden folgenden Tagen, Ikterus trat nicht auf. Exitus am 2. Okt.

Die Obduktion ergab an allen Organen den Befund hochgradiger Anämie, sonst keinen wesentlichen Befund.

Bei der histologischen Untersuchung fanden sich in der Leber bis auf die Gallenstauung dieselben Veränderungen wie bei Hund I, nur in den größeren Gallenwegen bestand geringe Stauung. Daneben fanden sich vereinzelt kleine nekrotische Herde, die etwa den 5. Teil eines Acinus einnahmen. Die übrigen Organe zeigten keine wesentliche Veränderung.

III. Versuch.

8. Okt. Subkutane Injektion von 10 ccm Immunhämolysin.

12. Okt. Starker Ikterus; Harn ikterisch. Blutbefund: Die roten Blutkörperchen zeigen Polychromatophilie, vereinzelt finden sich Normoblasten; polynukleäre Hyperleukocytose.

13. Okt. Ikterus zugenommen; Harn ikterisch. Blutbefund: Hämoglobinämie; das Blut in dünner Schicht ausgebreitet, gerinnt gut, nach wenigen Minuten typische Agglutination der roten Blutkörperchen. Das Serum des Hundes agglutiniert anderes Hundeblut (1 : 1), konzentriert oder mit isotonischer Kochsalzlösung verdünnt, nicht.

Im gefärbten Blutpräparat deutliche Größendifferenzen zwischen den roten Blutkörperchen, ferner zahlreiche kernhaltige, rote Blutkörperchen (Normoblasten), starke polynukleäre Hyperleukocytose.

14. Okt. Exitus.

Obduktionsbefund: Skleren und Haut stark ikterisch; die Leber fleckig gelb auf dunkelrotem Grunde, am Durchschnitt einzelne Acini gelb gefärbt; die Gallenblase mit dunkler Galle gefüllt. Knochenmark rot. Sonst kein wesentlicher Befund.

Bei histologischer Untersuchung der Leber fällt vor allem die sehr beträchtliche Gallenstauung auf, indem auch die intracellulären Gallen-

---

1) Die bei diesen Tieren gleichzeitig beobachteten Verfettungen in der Leber waren Gegenstand einer besonderen von H. Dr. Czeczowiczka durchgeführten Untersuchung.

kapillaren stark gefüllt, wie injiziert sind. In den Blutgefäßen der Leber findet sich eine Vermehrung der Leukocyten, die Leberzellen zeigen keine Degeneration, sind im Centrum und der Peripherie ziemlich gleich gut färbbar; die Centralvenen und Kapillaren nicht erweitert.

In den Nieren zeigte das Epithel der Harnkanälchen eine trübe Schwellung; in zahlreichen Harnkanälchen finden sich olivgrüne oder gelbbraune Cylinder. Die Epithelien einzelner Harnkanälchen enthalten ein feinkörniges gelbes oder braunes Pigment.

Die Milz ist sehr blutreich, die roten Blutkörperchen sind oft nur schwach färbbar. Oft sind sie zu scholligen, diffus rot gefärbten Klumpen verbacken. In den größeren Gefäßästen finden sich reichlich Leukocyten.

Das Herz und die Lunge ergeben keinen wesentlichen Befund.

IV. Versuch.

Vor der Injektion Zahl der roten Blutkörperchen 6 370 000 im Kubikmillimeter; Zahl der weißen Blutkörperchen 4200 im Kubikmillimeter.

3. Juni. Subkutane Injektion von 12 ccm Immunhämolysin.

4. Juni. Allgemeine Mattigkeit; die Schleimhäute blaß. Der Harn dunkelgelb, Faeces ockergelb.

Blutuntersuchung 18 Stunden nach der Injektion:

Deutliche Hämoglobinämie; das Blut gerinnt gut und zeigt, auf einer Glasplatte ausgebreitet, typische Agglutination. Im gefärbten Deckglaspräparat: Spärliche Normoblasten, keine Megaloblasten; beträchtliche Hyperleukocytose und zwar betrifft die Vermehrung vorwiegend die polynukleären Leukocyten (15—20 im Gesichtsfeld), nur in geringem Grade die einkernigen Leukocyten; keine Knochenmarkszellen.

5. Juni. Die Schleimhäute blaß, mit einem schwachen Stich ins Gelbliche; die Haut zeigt gleichfalls beginnenden Ikterus.

Blutuntersuchung: Zahl der roten Blutkörperchen 2 100 000; Zahl der weißen Blutkörperchen 45 600. Starke Hämoglobinämie.

Im gefärbten Präparat die roten Blutkörperchen an Zahl vermindert, mit Eosin schwächer tingierbar; sehr zahlreiche kernhaltige, rote Blutkörperchen (etwa 4 im Gesichtsfeld) und zwar vorwiegend typische Normoblasten mit excentrisch gelegenem, dunkel tingiertem Kern von dem gewöhnlichen Aufbau, daneben auch größere kernhaltige, rote Blutkörperchen mit großem, rundem und blässer gefärbtem Kern. Beträchtliche polynukleäre Hyperleukocytose (etwa 18—20 im Gesichtsfeld).

6. Juni. Allgemeine Decke und Schleimhäute stark ikterisch; Harn dunkelrot.

Blutbefund: Im wesentlichen identisch mit dem Befunde des Vortages; die Zahl der kernhaltigen roten Blutkörperchen und die Hyperleukocytose noch beträchtlicher. Exitus.

Obduktionsbefund: Allgemeine Decke ziemlich stark ikterisch gelb gefärbt, die Skleren stark ikterisch; Unterhautzellgewebe intensiv gelb gefärbt. Beide Lungen an der Oberfläche und am Durchschnitt gelbbraun; allenthalben lufthaltig. Das Herz im rechten Ventrikel schlaff, im linken starr; in den Herzhöhlen speckige, gelbbraune, faserstoffige Massen. Das Endocard gelb gefärbt, das Herzfleisch braungelb. Die Leber groß und plump, mit glatter, dunkelbraunroter Oberfläche, am Durchschnitt gelbrötlich marmoriert, indem auf rotbraunem Grunde hirsekorngroße, gelbliche Herde sichtbar sind, die acinöse Zeichnung etwas undeutlich. Die Gallenblase von gewöhnlicher Größe, prall gefüllt mit dunkelbrauner Galle. Die Milz etwa auf das Dreifache vergrößert, zungenförmig zugespitzt, mit glatter Kapsel, am Durchschnitt dunkelblaurot, spärlich Saft gebend. Beide Nieren größer und derber, plump, mit leicht abziehbarer Kapsel und glatter, serpentingrüner Oberfläche, auf welcher braunschwarze Pünktchen und Streifchen sichtbar sind. Am Durchschnitt die Zeichnung der Rinde deutlich, zahlreiche radiär gegen die Pyramiden verlaufende, dunkelgrüne bis braunschwarze Streifen aufweisend. Die Serosa der Darmschlingen gelbbraun, die Magen- und Darmschleimhaut ohne wesentlichen Befund. Das Knochenmark der langen Röhrenknochen hellrot.

Zur histologischen Untersuchung wurden Stückchen der verschiedenen Organe in 4-proz. Formollösung, Sublimat-Pikrin, Müller-Formol und Alkohol konserviert.

Die Leber zeigt eine ganz enorme Gallenstauung, die sowohl in den interacinösen Gallenwegen als in den intracellulären Gallenkapillaren zum Ausdruck kommt; letztere sind strotzend gefüllt und bilden, den Leberzellen entsprechend, ein zierliches, gelbgrün gefärbtes Netz. Die Injektion der Gallenkapillaren ist namentlich im Centrum der Acini, in der Umgebung der Centralvenen, am stärksten. Letztere sind sowie die in sie einmündenden Kapillaren erweitert, mit Blut gefüllt und enthalten sehr reichlich Leukocyten; in diesen sowie namentlich in den Endothelien der Kapillaren findet sich ein feinkörniges, gelbbraunes Pigment; auch die Leberzellen, besonders in der Umgebung der Centralvenen, sind pigmenthaltig. Durch die Erweiterung der Kapillaren im Centrum der Acini erscheinen

die Leberzellbalken daselbst komprimiert und wesentlich schmäler als in der Peripherie der Acini. Das Zellprotoplasma ist im Centrum der Läppchen von zahlreichen kleinen, doch auch größeren Fetttröpfchen durchsetzt und daher schlechter färbbar als in der Peripherie. Stellenweise finden sich, bald mehr im Centrum, bald in der Peripherie der Acini, kleine, unscharf begrenzte, nekrotische Herde, in deren Bereich die Leberzellen vollkommen untergegangen sind; diese Herde enthalten polynukleäre Leukocyten, Detritus und Kernfragmente. Bei Eisenreaktion erscheinen die pigmenthaltigen Endothelzellen der Leberkapillaren oft diffus blaßblau oder blaugrün gefärbt.

Die Milz ist sehr blutreich, dabei sind die roten Blutkörperchen zum großen Teil nur schwach färbbar, wie ausgelaugt, zum Teil zu unregelmäßigen, diffus rot gefärbten Klumpen verbacken. Bei Eisenreaktion sieht man sowohl frei in einzelnen größeren Blutgefäßen als auch in Pulpazellen eingeschlossene blaue oder grüne Körnchen und Tröpfchen, in den Gefäßen sogar Tropfen, die die roten Blutkörperchen an Größe übertreffen.

Bei histologischer Untersuchung der Niere zeigt sich in der Rinde zwischen den Glomerulusschlingen und der Bowman'schen Kapsel ein feinkörniger Detritus, geronnenem Eiweiß entsprechend. Das Epithel der Tubuli contorti ist gequollen, trübe, wie bestäubt. Im Lumen einzelner Gruppen von Harnkanälchen finden sich gelbrötliche oder rotbraune sowie einzelne olivgrün gefärbte Cylinder; einige der ersteren lassen deutlich ihre Zusammensetzung aus verklumpten oder verknitterten roten Blutkörperchen erkennen, während andere ebenso wie die grüngefärbten ganz homogen oder grobschollig erscheinen. Die rotgefärbten Cylinder färben sich bei Eisenreaktion graublau.

An der Muskulatur des Herzens ist keine Veränderung nachweisbar, die Querstreifung ist durchweg gut erhalten.

In der Lunge findet sich in den größeren Aesten der Arteria pulmonalis eine deutliche Leukocytose; die roten Blutkörperchen sind blaß gefärbt.

V. Versuch.

Vor der Injektion normaler Blutbefund.

7. Juni. Subkutane Injektion von 5 ccm derselben Immunhämolysin wie in Versuch IV.

8. Juni. Harn gelb gefärbt, enthält Gallenfarbstoff in Spuren.

Blutuntersuchung: Keine Hämoglobinämie. Im gefärbten Präparat: Ganz vereinzelt kernhaltige rote Blutkörperchen (Normoblasten), geringe Hyperleukocytose.

9. Juni. Harn dunkelrot, Gallenfarbstoff nicht nachweisbar.

Blutbefund: Deutliche Hämoglobinämie. Im gefärbten Präparat zahlreiche kernhaltige rote Blutkörperchen vom Charakter der Normoblasten (durchschnittlich eines im Gesichtsfeld), geringe Hyperleukocytose.

10. Juni. Schleimhäute blaß (kein Ikterus); Harn blutig gefärbt, Gallenfarbstoff nicht nachweisbar.

Blutbefund: Hämoglobinämie. Im gefärbten Präparat die Zahl der Normoblasten etwa wie am Vortage, die Hyperleukocytose beträchtlicher.

11. Juni. Kein Ikterus; der Harn dunkelbraunrot.

Blutbefund: Die Zahl der kernhaltigen roten Blutkörperchen hat beträchtlich zugenommen (durchwegs Normoblasten); starke polynukleäre Hyperleukocytose (etwa 18—20 im Gesichtsfeld).

12. Juni. Exitus.

Obduktionsbefund: Allgemeine Decke und Skleren nicht ikterisch; Unterhautzellgewebe nur mäßig fettreich, das Fettgewebe blaßgelb. Muskulatur welk. Beide Lungen frei, ihre Pleura glatt, rosenrot, am Durchschnitt die Lungen lufthaltig, von mittlerem Blutgehalt; das Blut hellrot, sehr wässerig. Das Herz in beiden Ventrikeln ausgedehnt; in beiden Herzhöhlen ziemlich feste, blaßrote, zum Teil schwarzrote Gerinnsel. Der linke Ventrikel ziemlich stark ausgedehnt, das Septum nach rechts hin ausgebaucht. Das Herzfleisch gelbbraun, sehr mürbe und zerreißlich. Die Milz im Längsdurchmesser auf das Doppelte vergrößert, dabei schmal und zungenförmig, ihre Oberfläche glatt; am Durchschnitt dunkelrot, wenig Saft gebend. Die Leber plump, mit gelbbrauner, stellenweise rötlich marmorierter Oberfläche, am Durchschnitt hellbraun, die Zeichnung etwas undeutlicher; die Gallenblase gefüllt mit dunkler Galle. Beide Nieren größer und plumper, mit leicht abziehbarer Kapsel und glatter Oberfläche, die braunrot gefärbt ist und allenthalben olivgrüne Fleckchen und Streifchen aufweist. Am Durchschnitt die Rinde etwas breiter, zeigt allenthalben radiär gegen die Pyramiden zu verlaufende grüne Streifen; dazwischen sind mehrere fettiggelbe Streifen erkennbar. Einzelne mesenteriale Lymphdrüsen an der Radix mesenterii leicht vergrößert. Die Schleimhaut des Magen-Darmtraktes ohne Befund. Das Knochenmark in den ventralen Anteilen dunkelrot, in den peripheren blaß rötlich.

Die histologische Untersuchung der Leber ergab einen ähnlichen Befund, wie in dem ersten Versuch: Erweiterung der Centralvenen und Kapillaren im Centrum der

Acini; in den Endothelien der Kapillaren sowie in den Leukocyten oft ein gelbbraunes, bisweilen dunkelbraunes oder schwarzes Pigment. Bei Eisenreaktion erscheinen diese Zellen diffus blaugrün gefärbt, während das Pigment seine Eigenfarbe behält. In den größeren Gallenwegen findet sich deutliche Gallenstauung, während dieselbe in den Gallenkapillaren fehlt. Vereinzelt sind in der Peripherie der Acini auch hier kleine nekrotische Herde nachweisbar, die den früher beschriebenen gleichen.

Die Milz ist sehr blutreich, die roten Blutkörperchen sind zum Teil wie ausgelaugt und schwach färbbar; stellenweise bilden sie unregelmäßig geformte, diffus rot gefärbte Klumpen. In der Peripherie zahlreicher Malpighi'scher Körperchen sind die venösen Sinus mit rot gefärbten, scholligen Massen erfüllt, die einer erstarrten, mit Hämoglobin imbibierten, eiweißhaltigen Flüssigkeit zu entsprechen scheinen. Bei Eisenreaktion sind sie blaßblau gefärbt und lassen stellenweise eine Zusammensetzung aus einzelnen Tropfen erkennen. Zugleich sieht man in zahlreichen Pulpazellen blaßblaue oder blaugrüne Tropfen und Körner; daneben ist noch ein gelbbraunes Pigment vorhanden.

Bei Untersuchung der Niere erscheinen die Glomeruli im allgemeinen ohne Veränderung, das Epithel der Harnkanälchen gequollen. In der Rinde finden sich Gruppen von Harnkanälchen, die einer Ferrein'schen Pyramide angehören, die mit homogenen oder scholligen, mit Eosin gelbrötlich oder intensiv rot gefärbten Massen ausgefüllt sind und geronnenem Blut entsprechen. Bei Eisenreaktion sind sie blaßblau bis grün gefärbt.

In der Lunge und dem Herzen kein wesentlicher Befund.

VI. Versuch.

Vor der Injektion normaler Blutbefund.

21. Juni. Subkutane Injektion von 3 ccm Immunhämolysin.

22. Juni. Blutbefund normal.

23. Juni. Leichte Hyperleukocytose, keine kernhaltigen roten Blutkörperchen.

24. Juni. Kein Ikterus; Harn gelbbraun, reichlich Gallenfarbstoff enthaltend.

Blutbefund: Hämoglobinämie. Im gefärbten Präparat keine kernhaltigen roten Blutkörperchen, deutliche Hyperleukocytose.

25. Juni. Harn wie gestern.

Blutbefund: Hämoglobinämie, im gefärbten Präparat spärliche Normoblasten, starke Hyperleukocytose.

Exitus.

Obduktionsbefund: Der Kadaver etwas abgemagert, an der allgemeinen Decke kein Ikterus, die Skleren blaß, mit einem leichten Stich ins Gelbliche. Beide Lungen blaß, an den vorderen Rändern rötlich imbibiert. Das Herz in beiden Ventrikeln schlaff, das Herzfleisch fahl, leichter zerreißlich. Die Leber braunrot, glatt, am Durchschnitt ebenfalls braunrot, ihre Zeichnung undeutlich. Die Milz etwa auf das Doppelte vergrößert, schmal, zungenförmig, ziemlich derb, wenig Saft gebend. Beide Nieren von gewöhnlicher Größe, ohne Veränderung. Magen- und Darmkanal ohne wesentlichen Befund.

Die histologische Untersuchung der Leber ergab im wesentlichen den gleichen Befund wie in dem vorigen Versuche. Auch hier bestand eine Erweiterung der Centralvenen und Kapillaren, sowie eine fettige Degeneration der Leberzellen im Centrum der Acini. In den größeren Gallenwegen fanden sich die Zeichen der Gallenstauung, die Gallenkapillaren waren hingegen nicht sichtbar. Einzelne Endothelzellen der intracinösen Kapillaren gaben deutliche Eisenreaktion (diffuse blaue oder blaugrüne Färbung). In der Peripherie einzelner Acini fanden sich ab und zu kleinste nekrotische Herde.

Der Befund der histologischen Untersuchung der Milz stimmte vollständig mit den beiden früheren Versuchen überein.

In den Nieren fand sich, abgesehen von einer trüben Schwellung des Epithels der Harnkanälchen, keine wesentliche Veränderung; Cylinder fehlten vollständig.

Das Herz zeigte keine Veränderung.

In der Lunge fanden sich vereinzelte bronchopneumonische Herde.

VII. Versuch.

Vor der Injektion normaler Blutbefund.

9. Juni. Intravenöse Injektion von 5 ccm Immunhämolysin.

10. Juni. Schleimhäute blaß, kein Ikterus; Harn blutig.

Blutbefund: Hämoglobinämie; einzelne Normoblasten, starke polynukleäre Hyperleukocytose.

11. Juni. Kein Ikterus; Harn blutig, Gallenfarbstoff nachweisbar.

12. Juni. Leichter Ikterus; beide Corneae getrübt; Harn dunkel, Blut enthaltend; Gallenfarbstoff nachweisbar.

13. Juni. Ikterus geschwunden.

14. Juni. Kein Ikterus, Harn lichtbraun, Gallenfarbstoff nachweisbar. Im Sedimente ausgelaugte rote Blutkörperchen.

Blutbefund: Deutliche Größendifferenzen, zwischen den roten Blutkörperchen zahlreiche Normoblasten, polynukleäre Leukocytose.

15. Juni. Kein Ikterus. Harn gelbbraun, Gallenfarbstoff vorhanden.

18. Juni. Im Blute zahlreiche Normoblasten, polynukl. Leukocytose.

24. Juni. Harn hellgelb. Im Blute Größendifferenzen zwischen den roten Blutkörperchen, sehr spärliche Normoblasten, keine Leukocytose.

In den folgenden Wochen erholte sich der Hund vollständig und zeigte einen normalen Blutbefund. Die histologisch untersuchten Organe dieses Hundes ergaben vollkommen normale Verhältnisse.

Aehnliche Versuche, wie die eben an Hunden mitgeteilten, wurden auch an Kaninchen ausgeführt. Das Immunhämolysin wurde durch Behandlung einer Ziege mit Kaninchenblut gewonnen. In Dosen von 3 und 5 ccm intravenös injiziert, hat dieses Serum akut toxische Wirkungen. Die Kaninchen gingen rasch nach der Injektion zu Grunde. Bei der Obduktion dieser Tiere, die sofort nach dem Tode vorgenommen wurde, fand man im rechten Herzen neben flüssigem dunkelroten Blute frische Blutgerinnsel der Herzwand fester anhaftend. Auch in den kleineren Lungengefäßen konnten frische Gerinnsel nachgewiesen werden. Ob dieser Befund in einen direkten Zusammenhang mit dem Immunserum zu bringen ist, sollen weitere Untersuchungen entscheiden. Nach subkutaner Injektion großer Mengen der Immunhämolysine konnte man am 5.—6. Tage eine Verminderung der roten Blutkörperchen nachweisen. Die mikroskopische Untersuchung des Blutes zeigte deutliche Größendifferenzen und Polychromatophilie an den Erythrocyten, sowie reichlich kernhaltige rote Blutkörperchen, zumeist vom Charakter der Normoblasten (daneben auch größere Formen), ferner Leukocytose. Das Bild entsprach vollkommen dem Blutbilde, welches bei Kaninchen nach Injektion der Bakteriohämolysine auftrat.

Die Tiere gingen nach einigen Tagen unter zunehmender Anämie zu Grunde. Ikterus wurde bei diesen Tieren niemals beobachtet.

Im Anschlusse an die Versuche mit Immunhämolysinen beschäftigten wir uns damit, nachzuweisen, ob es nicht gelingen dürfte, mit Bakteriohämolysinen bei Hunden ein ähnliches Krankheitsbild zu erzeugen.

Zu diesen Versuchen verwendeten wir Hämolysine eines Vibrio und des B. megatherium und injizierten die Gifte teils subkutan, teils intravenös. Sämtliche Versuchstiere (Hunde) blieben am Leben ohne daß Krankheitssymptome nachweisbar gewesen wären. Wodurch dieses negative Resultat bedingt war, konnten wir vorderhand nicht entscheiden. Da aber diese Hämolysine in vitro wirksam gefunden wurden und es uns auch gelungen ist, bei Kaninchen mit Bakteriohämolysinen ein schweres Krankheitsbild hervorzurufen, ist es nicht unwahrscheinlich, daß durch normale Antihämolysine oder durch anderweitige Bindungen die Hämolysine im Organismus unwirksam werden.

III.

Die zusammenfassende Betrachtung der vorangehenden Versuche lehrt, daß das Immunhämolysin, intravenös in bestimmten Mengen Hunden injiziert, einen akuten Tod bewirke. Diese Wirkung des Serums ist als eine rein toxische aufzufassen und steht mit der hämagglutinierenden oder hämolytischen Wirkung in keinem Zusammenhange. (Die akute Wirkung des mit Kaninchenblut gewonnenen Immunserums dürfte mit seiner gerinnungs-

alterierenden Wirkung zusammenhängen.) Nach subkutaner Injektion des Immunhämolysins (für Hunde) tritt bei entsprechender Menge und genügend lytischer Kraft desselben ein schweres Krankheitsbild auf. Dasselbe ist charakterisiert durch die Auflösung der roten Blutkörperchen, die zunächst zur Hämoglobinämie und in weiterer Folge zu einer schweren progressiven Anämie führt. Der Harn dieser Tiere ist blutig gefärbt und enthält auch reichlich ausgelaugte Blutkörperchen, Gallenfarbstoff ist zumeist im Harn nachweisbar. In sehr schweren Fällen, z. B. bei Injektion einer größeren Menge eines stark wirkenden Immunhämolysins, tritt auch schwerer Ikterus auf. Das Blutbild ist in allen Fällen das gleiche und wird charakterisiert durch fortschreitende Verminderung der roten Blutkörperchen, Auftreten von Poikylocyten und polychromatophile Degeneration, Auftreten zahlreicher Normoblasten, allenfalls auch größerer kernhaltiger roter Blutkörperchen. Daneben konstatiert man eine beträchtliche polynukleäre Leukocytose. Einen ganz analogen Blutbefund konnten wir in einem Falle paroxysmaler Hämoglobinämie beim Menschen, den wir der Freundlichkeit des Herrn Dr. Schur verdanken, beobachten: namentlich kurze Zeit ante mortem entsprach das Blutbild vollständig demjenigen, das wir bei unseren Versuchstieren ausgebildet fanden.

Entsprechend den während des Lebens beobachteten Symptomen zeigte der Obduktionsbefund der Hunde die schwere Anämie, allenfalls die ikterische Verfärbung der Organe.

Bei histologischer Untersuchung weist die Leber die deutlichsten Veränderungen auf. Stets findet sich eine fettige Degeneration im Centrum der Acini, die wir wohl als Folgeerscheinung der schweren Anämie auffassen dürfen. Die Erweiterung der Centralvenen und Leberkapillaren ist zum Teil auf die Verschmälerung der Leberzellbalken zurückzuführen, zum Teil als Folge der geschwächten Herzkraft, vielleicht auch einer leichten Niereninsufficienz aufzufassen. Stets war ferner eine Gallenstauung nachweisbar; die in jenen Fällen, in denen während des Lebens starker Ikterus bestand, einen ganz enormen Grad erreichte; nicht nur die größeren Gallenwege, sondern auch die Gallenkapillaren bis zu ihren feinen Anfängen in den Leberzellen waren prall gefüllt, so daß die betreffenden Präparate förmlich eine Injektion der Gallenkapillaren zur Anschauung brachten. Die spärlichen, kleinen, nekrotischen Herde, die in einzelnen Acinis nachweisbar waren, dürften wohl als Folge der Gallenstauung anzusprechen sein.

In der Milz aller Versuchstiere fanden sich reichlich rote Blutkörperchen, die nur schwach färbbar waren und wie ausgelaugt erschienen, als Ausdruck für die intravital beobachtete Hämoglobinämie. Durch die Wirkung des Hämolysins kam es zur Auflösung der roten Blutkörperchen, das Hämoglobin trat in das Blut über, während die Blutkörperchenschatten in der Milz abgelagert wurden. Hiermit steht auch der Befund in den Nieren in Einklang, indem sich in zahlreichen Harnkanälchen Blutcylinder fanden (vergl. auch den Befund von ausgelaugten Blutkörperchen im Harn der Tiere); einzelne Cylinder waren auch gallig gefärbt. Die intravital bestandene Hämoglobinämie ließ sich histologisch auch durch die Eisenreaktion nachweisen, indem sowohl in den Endothelien der Leberkapillaren als in der Milz Hämosiderin gefunden wurde.

Bei Kaninchen erzeugte Injektion eines Immunhämolysins ebenfalls eine schwere Anämie; Ikterus wurde nicht beobachtet.

IV.

Diese Versuche beweisen somit, daß ein hämolytisches Serum (und zwar ein Immunhämolysin) innerhalb des Organismus in gleicher Weise wirkt, wie außerhalb desselben, d. h. die roten Blutkörperchen auflöst.

Gleichzeitig sind aber diese Versuche auch nach anderer Richtung von Bedeutung.

Wir haben gesehen, daß sich infolge der hämolytischen Wirkung des Serums, falls dieselbe hinreichend stark war, Ikterus entwickelt. Da wir es nun heute bereits als festgestellt betrachten müssen, daß jeder Ikterus hepatogen ist und die hämatogene Entstehung des Ikterus als widerlegt angesehen werden darf, da uns aber andererseits die histologische Untersuchung zeigte, daß das eingeführte Gift keine Schädigung der Leberzellen zur Folge hatte (von der fettigen Degeneration im Centrum der Acini, die wohl niemals zum Ikterus führt, dürfen wir wohl absehen), so entsteht die Frage, wie der Ikterus in diesem Falle zu erklären ist. Nach unseren Versuchen müssen wir uns den Vorgang in folgender Weise vorstellen: Die unmittelbare Wirkung des Hämolysins ist die Hämoglobinämie. Der akute Blutzerfall führt zur quantitativen und qualitativen Gallenveränderung und Gallenstauung; ist letztere nur eine mäßige, so kann es wohl bereits zu einem geringen Uebertritt von Galle in die Blutbahn kommen, wie der Nachweis von Gallenfarbstoff im Harn zeigt, es entwickelt sich aber noch kein Ikterus. (Wir wissen ja auch aus der menschlichen Pathologie, daß im Harn der Gallenfarbstoff bereits zu einer Zeit nachweisbar ist, da noch kein Ikterus besteht.) Wird aber die Gallenstauung sehr hochgradig (Ueberfüllung der kleinsten Gallengänge und Gallenkapillaren), dann ist allenthalben reichlich Gelegenheit zum Uebertritt von Galle in die Blutbahn gegeben (wie es von Eppinger [5] für Fälle von Stauungsikterus histologisch auch wirklich nachgewiesen wurde), es dringt sehr reichlich Galle in das Blut ein und es entwickelt sich der Ikterus.

Litteratur.

1) Belfanti u. Carbone.
2) Cantacuzène, Annales de l'Inst. Pasteur. 1901.
3) Gruber, M., Münchener med. Wochenschr. 1901.
4) Kraus, R., Wiener klin. Wochenschr. Prot. d. Ges. d. Aerzte. 22. Nov. 1901.
5) Eppinger, H., Ziegler's Beiträge. 1902.

Le vaccin contre la peste.

Par le Dr. Gonçalves Cruz,
Directeur de l'Institut Sérumthérapique à Rio de Janeiro (Institut de Manguinhos).

Avec 2 figures.

Un fait aujourd'hui acquis en matière de prophylaxie, c'est incontestablement celui de la vaccination contre la peste. Dès la découverte du cocco-bacille de la peste par Yersin-Kitasato (1) on a eu l'idée de préparer un vaccin contre cette terrible maladie et l'idée est venue tout de suite de profiter pour atteindre ce but, les

principes établis par Pasteur, basés sur l'atténuation des virus qui fournissent les produits et connus en bactériologie sous le nom de „vaccins pasteuriens". C'est Hankin qui essaya les premiers pas sur ce sujet. Il n'a point réussi, parce qu'il a été impossible d'inoculer des individus avec un tel microbe quelque attenué qu'il soit, mais encore vivant et qui, n'ayant point de spores pour fixer son degré d'atténuation, pourrait acquérir la virulence primitive et produire des sérieux accidents.

Plus récemment Yersin et Carré (1) ont revenu sur ces idées, en préparant un vaccin avec le virus atténué de la peste. Mais ce procédé n'est pas encore entré dans la pratique, parce que selon nous renseignent les auteurs eux-mêmes. „Il est toujours grave d'inoculer à l'homme un bacille, qui, quelque atténué qu'il soit pourrait, peut-être, dans certains cas, causer des accidents . . . . ."

C'est alors, à l'immunité active consécutive à l'injection de cultures stérilisées, qu'on a eu recours pour la préparation du vaccin contre la peste.

C'est le médecin russe Haffkine (2) qui le premier a eu l'idée de préparer un vaccin anti-pesteux, en employant la méthode que ce même auteur avait déjà mis en pratique contre le choléra, et qui n'est plus qu'une modification de celle préconisée par Ferran (3) contre cette dernière maladie.

Cette méthode de vaccination anti-pesteuse a déjà été employée en grand aux Indes et ailleurs et pour cela on a déjà une base pour la juger. Et, d'après ce qu'on a observé, on peut conclure que:

1) Le vaccin Haffkine confère l'immunité contre la peste, surtout quand on renouvèle les inoculations avec des doses croissantes.

2) L'immunité acquise est longue (6 mois) pour que le procédé soit considéré pratique.

3) Le procédé de préparation du vaccin est passible de nombrables objections, en ce qui concerne à la variabilité du produit obtenu, à l'impossibilité du dosage et à la composition complexe du liquide immunisant.

Il était pourtant établi qu'il y avait un procédé de vaccination contre la peste et qu'il fallait modifier la technique de préparation de ce vaccin.

En effet des modifications ont été présentées successivement par:

1) La Commission allemande, envoyée aux Indes pour étudier la peste et composée de Koch, Gaffky, Pfeiffer, Sticker et Dieudonné (4).

2) Par Lustig et Galeotti (5).

3) Par Terni et Bandi (6, 7).

4) Par Calmette (8).

5) Par Besredka (9).

Le procédé de Lustig a été modifié par l'Institut pour l'étude des maladies infectieuses de Berne (10), et celui de la Commission allemande l'a été aussi par notre Institut (Institut de Manguinhos).

Nous allons faire très sommairement une étude critique des différents procédés ci-dessus mentionnés, avant de décrire la modification proposée par l'Institut de Manguinhos.

Le procédé d'Haffkine est passible des objections suivantes:

1) Le dosage ne peut pas être fait d'une façon tant soit peut rigoureuse.

2) Le vaccin est un liquide trop complexe, où il y a, á coté des

substances vraiment immunisantes, d'autres, plus ou moins irritantes, qui proviennent du bouillon de culture.

3) La préparation est trop longue.

Contre le procédé Lustig-Galeotti nous avons a objecter:

1) Les manipulations subies par les microbes exercent une influence nocive sur la toxine qu'ils contiennent, et est très sensible aux alcalis comme l'a demontré la Commission allemande.

2) Le vaccin solide n'est pas bien pratique, puisqu'il faut préparer des émulsions aseptiques, au moment d'être utilisées. La modification proposée par l'Institut de Berne est passible de toutes les objections que nous venons de faire, et encore de la 3me objection qui a été faite au vaccin Haffkine.

Le procédé Terni-Bandi ne nous semble pas bien pratique non plus parce que:

1) Le dosage du vaccin est presque impossible, à cause de la composition variable de l'exsudat péritonéal, employé comme matière prémière, pour la préparation du vaccin.

2) Les manipulations subies par le matérial virulent employé sont d'ordre à altérer la toxoprotéine pesteuse (action des alcalis sur la toxine).

3) Le vaccin sera trop cher puisqu'il faut sacrifier 1 cobaie pour chaque 50 ou 60 ccm de vaccin.

Le vaccin Calmette dont la préparation est entourée de réels dangers pour l'opérateur a encore l'inconvénient des vaccins solides.

Le vaccin Besredka n'est pas encore bien étudié et pour cela nous ne pouvons pas avoir sur lui une idée bien arrêtée. Il nous semble pourtant, qu'il est un procédé qui mérite une étude plus approfondie, d'autant plus, qu'il est basé sur le principe de la sérum-vaccination qui a été conseillé par Calmette et Salimbeni, Camara Pestana e Moraes Sarmento, à Porto, et qui a été aussi recommendé par Pfeiffer.

Nos sympathies pour ce nouveau procédé sont autant plus vives, que nous nous sommes battu, à Rio pour la pratique de la „sérum-vaccination“ anti-pesteuse, pendant la période épidémique. De tous les procédés il nous semble que le plus pratique est celui proposé par la Commission allemande, surtout si on le modifie dans le sens d'avoir un dosage rigoureux.

Dans ces conditions on pourra resumer ainsi les avantages du procédé:

1) Le vaccin peut être constitué par des corps microbiens, à l'éxclusion d'autres éléments irritants non vaccinants.

2) Possibilité d'un dosage rigoureux.

3) Rapidité et sureté dans la confection du vaccin.

Voici comme a été comprise par le prof. Tavel de Berne (10) l'idée omise par la Commission allemande à Bombay, pour la préparation du vaccin anti-pesteux: Avec une sémence provénante d'une culture du bac. Yersin, en sérum, on sème de l'agar incliné dans de flacons à large surface. La culture maintenue à 30° C, pendant 3 jours, est emulsionée avec du bouillon et le liquide ainsi obtenu est sterilisé à l'étuve pendant 1 heure à 65° C. Pour chaque 10 cm carrés de culture on ajoute 3 ccm de bouillon et on injecte 3 ccm à un homme adulte. Les savants allemands conseillent d'ajouter 0,5 g d'acide phénique au vaccin et, comme dosage, ils croient qu'on peut injecter à un homme une culture de 48 h. en tube d'agar (4).

La modification, proposée par notre Institut, est basée surtout dans le dosage aussi rigoureux que possible du vaccin, par la balance hormis certains petits details comme la substitution par de l'eau physiologique du bouillon, pour faire l'émulsion et l'emploi des cultures faites à la température du laboratoire. Voilà les détails de préparation du vaccin. selon la technique employée à l'Institut de Manguinhos, à Rio de Janeiro.

Les différentes étapes suivies dans la confection du vaccin sont:

1) obtention d'une sémence de virulence constante,
2) cultures,
3) préparation et stérilisation de l'émulsion,
4) dosage,
5) distribution en flacons.

1) Semence. Pour que l'on puisse obtenir un bon vaccin antipesteux il faut employer des cultures très virulentes et pour cela il est indispensable de maintenir la virulence du microbe par le passage successif du cocco-bacille par l'organisme d'animaux sensibles.

Pour arriver à ce but il vaut mieux employer un des procédés suivants qui exaltent au plus haut degré la virulence du microbe de la peste, déposition de culture en agar sur la muqueuse nasale (Metchnikoff [11], Batzaroff [12]), déposition de la culture sur la conjonctive (Koch et Pfeiffer [13]); déposition de la culture sur la peau rasée des cobayes (Weichselbaum, Albrecht et Ghon [14]), cultures en sac de collodion, inoculations péritonéales simultanées de cultures et d'acide lactique (Institut de Manguinhos).

Cultures. Avec la semence de virulence constante, obténue par un des procédés ci dessus décrits on fait des cultures sur de l'agar glycériné à 4 % étendu sur une large surface de 220 qcm dans de bouteilles de Roux de 1200 ccm de capacité. Pour empêcher l'éxsudation de l'eau pendant le réfroidissement, l'agar est chauffé à 120° C, pendant $^{3}/_{4}$ d'heure (Chantemesse [15]). L'ensemencement des bouteilles, ainsi preparées, est fait avec une culture en bouillon, qu'on puise, avec une pipette en boule et qu'on fait promener sur toute la surface d'un milieu nutritif. Les bouteilles, ainsi ensemancées, sont conservées hors de l'étuve, à la température du laboratoire comme l'ont conseillé Markl (16) et Lignière (17). Ainsi on pourra obtenir le maximum de virulence.

Après 48 heures de culture on fait

l'émulsion. Pour cela on introduit dans chaque bouteille, au moyen d'une pipette en boule, 16 ccm d'une solution physiologique de sel de cuisine (à 7,5 ‰). On fait promener ce liquide sur la culture pour bien la mouiller. On introduit après dans la bouteille un morceau de fil de platine, refroidi après incandescence, et dont le but est de décoller la culture en l'émulsionnant avec de l'eau salée. Pour obtenir ce résultat on donne un mouvement de bascule à la bouteille et comme ça on fait promener le fil de platine sur toute la surface de l'agar. On aspire l'émulsion avec une pipette en boule et, pour la rendre bien homogène (ce qui facilite la stérilisation), on la fait traverser une toile métallique à mailles étroites, sterilisée et on reçoit l'émulsion dans des petits matras Pasteur, dans lesquels elle sera stérilisée.

Stérilisation. Celle-ci est obtenu par un chauffage à l'étuve à 65° C pendant une heure. On employe une étuve à eau, avec thérmoregulateur, et la température est prise avec un thermomètre, dont le

réservoir plonge dans de l'eau physiologique placée dans un flacon identique à celui qui contient l'émulsion. Le liquide de ce flacon est mis à l'étuve en même temps que l'émulsion et on commence seulement à compter le temps (1 h.) quand sa colonne atteint 65° C.

Cette opération doit être menée avec un soin extrême, parce qu'il faut avoir la certitude de la mort de tous les microbes dont on ne peut pas s'en passer, puisque ce ne sont qu'eux qui constituent la substance immunisante du vaccin antipesteux (Pfeiffer [18]).

La stérilisation finie, on laisse réposer l'émulsion, pendant 24 h. et l'on procède à la

vérification de la stérilité de l'émulsion. Bien qu'on sache, d'après les études de Toptschieff (19) que le bacille de la peste, placé dans un milieu liquide, succombe après une permanence de 30' à l'étuve chauffée à 54° C, il est toujours indispensable de vérifier la stérilité de l'émulsion. Dans ce but, on fait des larges ensemencements, avec le matérial sterilisé, qui est en même temps injecté dans la cavité péritonéale d'animaux sensibles. Si l'animal vient à succomber, on fait une rigoureuse autopsie, en faisant des ensemencements avec l'exsudat péritonéal et la pulpe de la rate. Comme ça on pourra avoir une certitude absolue que l'animal est mort de l'intoxication et non de l'infection pesteuse.

Dès qu'on a la certitude de la stérilisation de l'émulsion on fait le

dosage du vaccin. La Commission allemande à Bombay a établi, comme dose vaccinante pour un homme adulte, une dilution stérilisée d'une culture en tube d'agar de bac. de la peste, agée de 48 h. et faite à l'étuve à 35° C.

Dans la pratique cette manière de doser est impossible. Le prof. Tavel (10) a modifié ce dosage comme il a été dit, quand nous avons décrit les différents procédés de préparation du vaccin. Encore le procédé de Tavel n'inspire pas de confiance et nous croyons que c'est pour cela que le savant professeur suisse, tout en réconnaissant les grands avantages du vaccin de la Commission allemande a adopté le procédé Lustig, qu'il a modifié, et qui permet un dosage plus rigoureux.

Etant convaincu par des expériences faites de la supériorité du procédé de la Commission allemande, l'Institut de Manguinhos a tâché de trouver une manière de procéder à un dosage rigoureux du vaccin allemand. Et le problème a été resolu par le dosage au moyen de la balance, après connaissance de la valeur pondérale moyenne de cultures du bac. de la peste en tube d'agar.

Pour arriver à ce résultat il a été nécessaire de commencer par la

détermination du poids moyen d'une culture du bac. de la peste en tube d'agar. Pour cela on a ensemencé par strie avec une semance de virulence constante du bac. de la peste une série de tubes de différents diamètres et de longueurs différentes conténant de l'agar glycériné à 4%, solidifié en bec de flûte. Les ensemencements ont été faits avec des quantités différentes de sémence, et les stries d'ensemencement ont été aussi de longueurs différentes. On avait enlevé toute eau de condensation des tubes.

Les cultures sont alors, maintenues à l'étude à 35° C, pendant 48 heures, au bout desquelles on les émulsione dans une quantité connue d'eau distillée. L'émulsion est stérilisée à 65° C pendant 1 heure.

Le liquide ainsi préparé contient, outre les corps microbiens, toutes les matières minérales et organiques existantes dans le milieu nutritif et solubles dans l'eau distillée.

L'émulsion totale est alors évaporée, au bain-marie, dans une capsule en platine, préalablement tarée.

Ce résidu est pésé, après déssèchement, pendant 24 h., sur l'acide sulfurique. Ce résidu est composé, d'une part, par les corps microbiens et, de l'autre, par les substances de l'agar, solubles dans l'eau.

En soumettant aux mêmes manipulations un même nombre de tubes, remplis avec la même quantité du même milieu de culture, mais sans ensemencement préalable, on aura un résidu qui sera égal à celui de la première opération, moins les corps microbiens, dont le poids sera alors calculé par différence.

Le chiffre ainsi obtenu divisé par le nombre de tubes employés, fournira le poids moyen d'une culture en tube d'agar, évoluée à 35° C pendant 48 h. ou encore: le poids des corps microbiens qu'on doit injecter à un homme adulte pour le vacciner contre la peste.

En connaissant le poids de la dose vaccinante, il est, à présent facile de doser l'émulsion concentrée dont nous avons parlé au debut de cet exposé.

Voilà comme l'on procède: Avec une pipette graduée et stérilisée on prend, après vigoureuse agitation de l'émulsion, une quantité quelconque de celle-ci qu'on évapore à siccité au bain-marie dans une capsule en platine tarée, qui est pesée, après séchage de 24 heures, sur de l'acide sulfurique.

Le poids du résidu obtenu est composé des parcelles suivantes: corps microbiens, produits solubles dans la solution salée employée pour la confection de l'émulsion.

La solution physiologique étant connue, on peut rétrancher le poids de sel marin.

Les poids des produits solubles de l'agar peut être evalué, par une opération analogue à celle que nous avons décrit en traitant de la détermination du poids moyen d'une culture en tube (traitement du milieu de culture non ensemencé par le même liquide qui a servi pour la confection de l'émulsion). En rétranchant le poids des substances dissoutes on aura le poids des corps microbiens.

Il y a encore un autre moyen plus pratique et qui consiste à laver et décanter successivement le dépôt microbien, avec la solution physiologique, en éliminant ainsi les produits solubles avant de procéder à l'évaporation de l'émulsion. Si l'on procède de la sorte, la résidu de l'évaporation sera formée des corps microbiens et du sel marin, à l'exclusion des matières solubles provénantes du milieu nutritif.

Si l'on retranche le poids connu du sel de la solution physiologique, on aura tout de suite le poids des corps microbiens. Il ne reste plus qu'à diluer l'émulsion concentrée avec de l'eau physiologique, de façon qu'on obtienne dans un volume déterminé — 2 ccm, p. ex. — le poids des corps microbiens correspondant à une culture en tube d'agar, où ce qui revient au même; à la dose vaccinante pour un homme adulte.

Un exemple fera mieux comprendre ce que nous venons de dire: Supposons qu'on prenne 2 ccm de l'émulsion lavée, et qu'on obtienne, après évaporation un extrait de 80 mg. Ce poids est constitué d'une part par les corps microbiens et d'autre par le sel marin, les matières dissoutes provénantes du milieu de culture étant éliminées par les

lavages antérieures suivies de décantations. Comme on connait le titre de la solution saline employée aux lavages (7,5 g p. 1000) on sait qu'il y a à retrancher des 80 mg d'extrait, 15 mg de sel marin et on sait ainsi qu'il y a en 2 ccm d'émulsion 65 mg de corps microbiens.

En supposant, d'un autre coté, que le poids moyen d'une culture en tube d'agar de l'échantillon du bacille de la peste employée est de 3 mg, il est facile, au moyen d'un simple calcul, de déterminer la quantité d'eau physiologique qu'il faut ajouter à l'émulsion pour avoir un liquide dans 2 ccm duquel, p. ex. il y aura les 3 mg de microbes.

Dans notre exemple on pourra faire le calcul suivant, très simple d'ailleurs: Si en 2 ccm d'émulsion, concentrée, il y a 65 mg de microbes, dans quelle quantité d'émulsion il y aura les 3 mg, qui représentent la dose vaccinante?

$$2 \text{ ccm} : 65 \text{ mg} :: x : 3 \text{ mg} \therefore x = \frac{3 \times 2}{65} = 0{,}0923 \text{ ccm}$$

Il faudra alors ajouter à chaque 0,0923 ccm de l'émulsion concentrée la quantité d'eau physiologique nécessaire pour compléter 2 ccm c'est à dire: 1,9077 ccm. Si l'on connait la quantité d'émulsion concentrée qu'on dispose, il est très facile, au moyen d'une simple proportion, de faire le calcul de la quantité totale d'eau physiologique à ajouter pour avoir le vaccin. Supposons que nous ayons 16 ccm d'émulsion concentrée:

$$0{,}0923 \text{ ccm} : 1{,}9077 \text{ ccm} :: 16 \text{ ccm} : x \therefore x = \frac{1{,}9077 \text{ ccm} \times 16 \text{ ccm}}{0{,}0923 \text{ ccm}} = 330{,}66 \text{ ccm}$$

Pourtant nous avons à ajouter, au 16 ccm de notre émulsion, 330,66 ccm, d'eau physiologique pour avoir un liquide dont chaque 2 ccm contient 3 mg de microbes morts, ce qui revient au même de dire: la quantité de microbes existant dans une culture en tube d'agar, agée de 48 h. et conservée à l'étuve à 35° C; ou, encore, une dose vaccinante pour un homme adulte, selon les indications de la Commission allemande.

Conservation du vaccin. Pour faciliter la conservation du vaccin on peut ajouter 0,5 ccm d'acide phénique. Il est très important d'ajouter cet antiseptique après la stérilisation de l'émulsion. Si on faisait le contraire, le liquide perdrait ses propriétés vaccinantes comme l'a demontré la Commission allemande.

Pour la mise en flacons du vaccin, à l'abri de contamination on emploie à l'Institut de Manguinhos un appareil que nous passons à décrire sous le nom

d'appareil distributeur. Cet appareil (fig. 1) est composé de deux parties *A* et *B* rassemblées par un tube en caoutchouc. *A* c'est un flacon qui sert de dépôt à l'émulsion vaccinique; *B* c'est l'appareil mensurateur et distributeur. Le flacon *A*, de 2 litres de capacité est fermé par un bouchon en caoutchouc avec 2 trous. Ces deux ouvertures sont traversées par deux tubes en verre: 1) *a* un petit tube recourbé et étranglé, ayant à l'intérieur une bourre d'ouate. Ce dispositif permet la circulation de l'air dans le flacon *A*. 2) *b* un tube plus long recourbé en angle droit dont une des branches plonge jusqu'au fond du flacon et l'autre est reliée par un tube en caoutchouc (*t*) avec la partie *B* de l'appareil. Celle-ci est composée d'une burette de précision graduée en centimètres cubiques.

La partie inférieure de cette burette est reliée au moyen d'un

mince tube en caoutchouc (b') avec un tube en verre éfilé, recourbé en angle droit et fermé à la lampe.

Entre les parties A et B de l'appareil est placé un dispositif C (fig. 2) destiné à permettre l'entrée et la sortie de l'air dans la burette. Ce dispositif est formé par un tube en verre en ⊢, à l'intérieur de la branche verticale (c) duquel et soudé à sa partie supérieure un autre tube en verre (c'). Ce tube mince, qui donnera passage au liquide, émerge à l'intérieur de la burette en laissant un éspace annulaire par

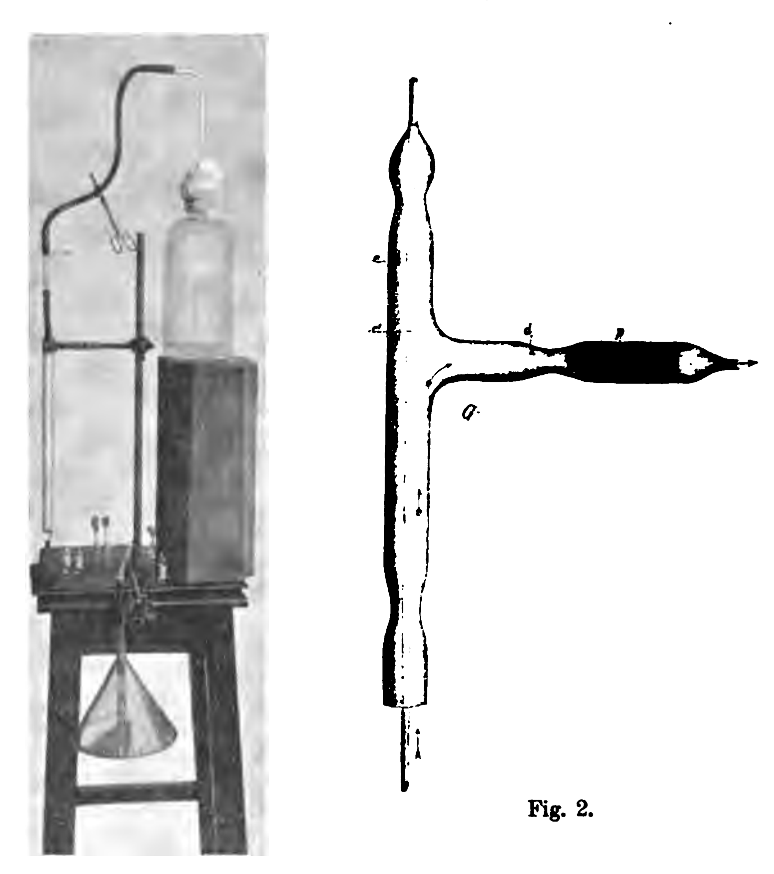


Fig. 1.

Fig. 2.

le quel se fera la circulation de l'air, à travers la branche horizontale (d). à l'intérieur de laquelle il y a un tampon d'ouate.

Le fonctionnement de l'appareil se fait en 2 temps:

1) Remplissage du depôt A avec le vaccin.

2) Mensuration et distribution du vaccin dans des tubes stérilisés.

L'appareil monté, on ferme à la lampe le tube C' et si l'on veut aussi l'extrémité d du tube C, qui peut etre aussi fermée avec un tube en caoutchouc muni d'une pince.

Après avoir mis quelques gouttes d'eau à son intérieur on le stérilise à l'autoclave, ayant protégé le bouchon en caoutchouc du

flacon *A*, avec une couche d'ouate maintenue par quelques tours de ficelle.

Le remplissage de l'appareil est fait, en aspirant le vaccin à travers le tube (*e*) qui a été stérilisé à l'intérieur d'un tube à essai.

L'aspiration est faite au moyen d'une trompe à eau, reliée au tube *a* (*A*). Au moment de l'aspiration on maintient fermée la branche *d* du dispositif de l'air (*C*).

L'aspiration terminée on met une pince sur le tube *b'* et on peut commencer la distribution.

Pour cette opération voilà comme on doit disposer l'appareil: On soulève le flacon *A* jusqu'à ce que sa partie inférieure soit placée sur un plan supérieur à l'extrémité inférieure du petit tube en verre *c'* (*C*). Au moyen d'une poire Richardson adaptée au tube *a* (*A*) on insufle de l'air dans le flacon *A*. On agite vigoureusement le liquide et on enlève une pince placée sur le tube *t*. Le liquide monte ainsi par le tube en caoutchouc et tombe à l'intérieur de la burette.

Par le tube éfilé *e*, qui est protégé contre les poussières par un entonnoir renversé et mouillé, on distribue le vaccin dans de petits flacons efilés, qui seront fermés à la lampe. Chaque flacon reçoit une dose de 2 ccm qui est mesurée sur la burette graduée. Pour faire sortir le vaccin de la burette on ouvre une pince appliquée sur le tube (*b'*), après avoir ouvert la branche *d* du dispositif *C*.

Toutes les fois qu'on fera passer le vaccin de *A* à *B*, ce qui aura lieu par syphonage, dès qu'on ouvrira la pince appliquée sur le tube *t* il faut agiter fortement le liquide, et il convient de faire passer chaque fois seulement une petite quantité de vaccin, afin d'éviter la sédimentation des microbes dans la burette, ce qui produirait une concentration du vaccin au fond de la burette et une subséquante diluition dans ses parties supérieures.

Le vaccin ainsi préparé est livré en petites empoules de verre fermées à la lampe et conténant une dose pour un homme adulte.

C'est avec ce vaccin qu'on a fait dernièrement presque toutes les vaccinations aux endroits du Brésil où on a constaté, dans les derniers temps, des épidemies de peste (Rio, Campos, Rio Grande do Sul etc.) et les résultats obtenus ont été très satisfaisants: jusqu'à présent on n'a pas eu à déplorer des cas de peste chez les individus ainsi vaccinés, selon les renseignements qui nous ont été fournis.

Bibliographie.

1) Yersin et Carré, Comptes rendus du XII. Congrès international de médecine. Paris 1900. — Séction de médecine et chirurgie militaires. Sous-section coloniale. p. 54.
2) Haffkine, W. M., The plague prophylactic. (Indian med. Gaz. Vol. XXXII. p. 201. Resumé in Baumgarten's Jahresbericht. 1897. p. 434.)
3) Ferran, L'inoculation préventive contre le choléra morbus asiatique. Traduit par E. Duhourcan. Paris 1863.
4) Gaffky, Pfeiffer, Sticker und Dieudonné, Bericht über die Thätigkeit der zur Erforschung der Pest im Jahre 1897 nach Indien entsandten Kommission. Berlin 1899.
5) Lustig, Sieroterapia e vaccinazioni preventive contra la peste bubbonica. Torino 1899.
6) Terni, Camillo e Bandi, Ivo, Nouvelle méthode de préparation du vaccin anti-pesteux. (Revue d'Hygiène et Police Sanitaire. 1900. No. 1. p. 62.)
7) — —, Bereitung der antipestösen Lymphe aus dem peritonealen Exsudat der infizierten Tiere. (Dtsch. med. Wochenschr. 1900. No. 29. p. 463.)

8) Calmette, Conférence faite à Londres le 14 novembre 1900. (Public board of health. Cit. par H. Pottevin.)
9) Besredka, Comm. à l'Académie des Sciences. Séances du 2 et 9 juin 1902. (Sem. médicale. 1902. p. 197.)
10) Tavel, Krumbein und Glücksmann, Ueber Pestschutzmaßregeln. (Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskr. Bd. XL. 1902. p. 239.)
11) Metchnikoff, E., La peste. Congrès de Moscou. (Ann. de l'Inst. Pasteur. T. XI. p. 737.)
12) Batzaroff, Pneumonie pesteuse expérimentale. (Ann. de l'Inst. Pasteur. 1899. p. 385.)
13) Koch, R., Reiseberichte über Bubonenpest. Berlin 1901.
14) Weichselbaum, Albrecht und Ghon, Ueber Pest. Wien.
15) Chantemesse, Recherche du bac. typhique dans l'eau potable. (Presse médicale. 1891. p. 261.)
16) Markl, Weitere Untersuchungen über die Pesttoxine. (Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskr. Bd. XXXVI. p. 401.)
17) Lignière, J., Sur le bacille pesteux et les injections intraveneuses massives du sérum Roux-Yersin, dans le traitement de la peste. (Ann. de l'Inst. Pasteur. 1901. No. 10.)
18) Pfeiffer, Bakteriologische und parasitologische Kongresse, abgehalten am 19. und 20. Oktober 1899 im kaiserlichen Gesundheitsamt. (Centralbl. f. Bakt. etc. Abt. I. Bd. XXVI. p. 735.)
19) Toptschieff, Beitrag zum Einfluß der Temperatur auf die Mikroben der Bubonenpest. (Centralbl. f. Bakt. etc. Abt. I. Bd. XXIII. p. 730.)

Untersuchungen von Nährböden zur quantitativen Schätzung von Bakterien in Wasser und Abwässern.

Von

Stephen De M. Gage,

Biolog an der Untersuchungsstation zu Lawrence,

und

Earle B. Phelps [1].

Es ist eine den Bakteriologen wohlbekannte Thatsache, daß bei quantitativer Bestimmung der Wasserbakterien wir nur einen kleinen Prozentsatz der Gesamtheit der in dem betreffenden Wasser vorhandenen Bakterien zählen. Dies beweist die Betrachtung der großen Zahl nitrifizierender Winogradski'scher Bakterien und die vielen Arten pathogener und anaërober Bakterien, die sich in unseren gewöhnlichen Nährböden unter den gewöhnlichen Bedingungen quantitativer Arbeit nicht entwickeln. Man hat jedoch immer stillschweigend angenommen, daß alle Resultate, die mit einem Nährboden von bestimmter Zusammensetzung gewonnen waren, untereinander vergleichbar wären oder mit anderen Worten, daß diese Resultate zwar nicht die Gesamtzahl der vorhandenen Bakterien darstellen, wohl aber einen gewissen, nahezu konstanten Prozentsatz der Gesamtzahl.

Wenn dies der Fall ist, so erfüllt ein Nährboden von bestimmter Zusammensetzung, der zu jeder Zeit leicht vervielfältigt werden kann,

---

1) Abdruck aus den Verhandlungen der 29., im September 1901 zu Buffalo abgehaltenen Jahresversammlung der American Public Health Association; übersetzt von Fritz Busse in Radebeul bei Dresden; überreicht von Bezirksarzt Dr. W. Hesse in Dresden.

alle Anforderungen, die man an einen vollkommenen Nährboden stellen kann.

Die Zusammensetzung der Nährböden, die sich gegenwärtig in allgemeinem Gebrauche befinden, ist so kompliziert, daß es beinahe unmöglich erscheint, zwei einander völlig gleiche Nährgelatinen oder Agar herzustellen, und es erfordert die peinlichste Aufmerksamkeit bis in die kleinsten Einzelheiten, um uns in den Stand zu setzen, quantitative, einigermaßen untereinander vergleichbare Ergebnisse zu erhalten.

Von Fuller und Anderen angestellte Versuche haben gezeigt, daß Veränderungen in der Endreaktion eines Nährbodens beträchtliche Aenderungen in der Zahl der in diesem Nährboden zur Entwickelung kommenden Bakterien bedingt, und Sedgwick und Prescott haben gezeigt, daß kleine Veränderungen in der Menge der Bestandteile oder die Verwendung verschiedener Sorten vou Gelatine beträchtliche Veränderungen im Bakteriengehalte verursachen. Die neuesten Versuche von Hesse und Niedner zeigen, daß es möglich ist, einen Nährboden herzustellen, welcher, einfacher in seiner Zusammensetzung als die gewöhnlichen Nährgelatinen, weit größere Zahlen von Bakterien in einem gegebenen Wasser ergiebt, als die gewöhnlichen Methoden. Im Folgenden gedenken wir die Veränderungen zu zeigen, die durch Variationen in der Zusammensetzung der Nährböden hervorgebracht werden und darzulegen, daß eine Vereinfachung der gewöhnlichen Nährböden ein Ansteigen der Bakterienzahl bedingt.

Unsere Methode, Resultate auszudrücken.

Alle Resultate unserer Versuche sind ausgedrückt nach dem prozentualen Verhältnisse irgend eines in der Serie enthaltenen Nährbodens zu demjenigen mit der höchsten Zahl. In allen Tabellen, die Nährstoffagar enthalten, ist jeder Nährboden direkt mit diesem, die höchsten Zahlen ergebenden, verglichen worden und außerdem mit jedem anderen Nährboden der Tabelle.

In jedem Falle stellen die angeführten Zahlen das Durchschnittsergebnis von mindestens 4 einzelnen Vergleichen mit den verschiedenen in der Tabelle genannten Wasserarten dar. Es kommt häufig vor, daß die Zahlen unzuverlässig werden infolge von Verflüssigung und Ausbreitungen. In unseren Tabellen haben wir Zahlen für Tage nach Erreichung des Maximums nicht mehr registriert, sondern dieses Maximum als die Zahl ausgeworfen, die an jedem der folgenden Tage festgestellt werden würde. Diese Methode des Registrierens ist unseres Erachtens genauer, da das Verhältnis, in dem die Zahlen nach Erreichung des Maximums zurückgehen, bei jeder Platte anders zu sein scheint und wir niemals irgend welche Beziehungen in dieser Hinsicht zwischen 2 Platten oder 2 Wassersorten haben entdecken können.

Zusammensetzung und Herstellung der Nährböden.

Herstellung. Mit Ausnahme des mit Nährstoff zubereiteten sind alle Nährböden nach dem von Fuller und Copeland im 1895er Berichte des Massachusetter Gesundheitsamtes hergestellt worden.

Der Nährstoff enthaltende Nährboden wurde nach obigem Verfahren hergestellt, nur mußte die Lösung neutral gemacht werden, ehe der Nährstoff hinzugefügt wurde. Dieses war notwendig, weil bei Zutritt von Säure oder Alkali eine Veränderung vor sich geht und in dem

Nährstoffe ein Niederschlag erfolgt, der, wie die Versuche gezeigt haben, die Zahl der sich entwickelnden Bacillen nachteilig beeinflußt.

Reaktion. Alle ohne Nährstoff hergestellten Nährböden hatten übereinstimmend 1,5 Proz. Säure, welche Reaktion bei Benutzung von Lawrencer Wassern die günstigste ist. Mit Nährstoff zusammengesetzte Nährböden haben sich gegen Phenolphthaleïn neutral verhalten.

Zusammensetzung. Die Zusammensetzung der verschiedenen zur Anwendung gekommenen Nährböden war folgende:

Regulärer Agar (wie in der Versuchsstation zu Lawrence gebräuchlich), 1 Proz. Agar, 1 Proz. Pepton, 3 Proz. Glycerin, in Fleischbrühe;
Agar ohne Zusatz, 1 Proz. Agar in Wasser;
Peptonagar, 1 Proz. Agar, 1 Proz. Pepton in Wasser;
Bouillonagar, 1 Proz. Agar in Fleischbrühe;
Standardgelatine, 12 Proz. Gelatine, 1 Proz. Pepton, 0,5 Proz. Kochsalz in Fleischbrühe;
Gelatine ohne Zusatz, 12 Proz. Gelatine in Wasser;
Peptongelatine, 12 Proz. Gelatine, 1 Proz. Pepton in Wasser;
Bouillongelatine, 12 Proz. Gelatine in Fleischbrühe;
Nährstoffagar, 1 Proz. Agar, 1 Proz. Nährstoff in Wasser;
Nährstoffpeptonagar, 1 Proz. Agar, 1 Proz. Nährstoff, 1 Proz. Pepton in Wasser;
Nährstoffbouillonagar, 1 Proz. Agar, 1 Proz. Nährstoff in Fleischbrühe;
Nährstoffglycerinagar, 1 Proz. Agar, 1 Proz. Nährstoff, 3 Proz. Glycerin in Wasser;
Nährstoffgelatine, 12 Proz. Gelatine, 1 Proz. Nährstoff in Wasser.

Alle Bestandteile obiger Nährböden, Fleischbrühe mit inbegriffen, stammten aus derselben Lieferung, so daß Variationen infolge Verschiedenheit der Komponenten ausgeschlossen waren.

Wirkung variierter Nährsubstanzmengen.

Um zu zeigen, welche Wirkung verschiedener Nährsubstanzgehalt im gewöhnlichen Agar und in Gelatine hervorbringt, wurden diese beiden Nährböden in 3 Stärken hergestellt, eine mit der gewöhnlichen Menge von Pepton und Fleischbrühe, eine zweite mit der halben und eine dritte mit der doppelten Menge. Nachstehende Aufstellung giebt die relativen Zahlen der in diesen Nährböden erhaltenen Bakterien an.

Proz. der gewöhnlichen Menge Pepton u. Fleischbrühe	50	100	200
Gelatine	56	95	72
Agar	39	100	78

Hieraus folgt, daß die relative Differenz bei Gelatine geringer ist, als bei Agar. Bemerkenswert ist, daß die Resultate bei Agar besser waren, als bei Gelatine. Dieses ist nicht ungewöhnlich, obwohl der Durchschnitt einer langen Vergleichsserie gewöhnlich zeigt, daß Gelatine etwas besser ist als Agar.

Wirkung verschieden großer Steifheit.

Man hat gewöhnlich den Umstand, daß Gelatineplatten höhere Zahlen ergeben, zum Teil durch die Verschiedenheit der Steifheit dieser beiden Nährböden erklärt. Auf Grund dieser Thatsache haben mehrere

Beobachter die beiden Nährböden in verschiedenen Proportionen gemischt in der Absicht, einen zu finden, der die guten Eigenschaften beider vereinigt.

In dieser Richtung ist es uns gelungen, einen Nährboden herzustellen, der etwas besser ist als Gelatine oder Agar allein, aber die größere Schwierigkeit der Herstellungsweise läßt es zweifelhaft erscheinen, ob die Resultate die Mühe lohnen. Dieser Nährboden ist eine Mischung der gewöhnlichen Nährgelatine und Agar im Verhältnis von 1 Teil Agar zu 3 Teilen Gelatine. Solche Nährböden gaben etwas höhere Durchschnittszahlen als Gelatine oder Agar allein und hatten den Vorzug, nicht durch Ausbreitungen getrübt zu werden, und das Schmelzen wurde gerade genug gehemmt, um am 4. Tage gute Zählungen zu gestatten. Ferner scheinen die Eigentümlichkeiten der Kulturen der verschiedenen Arten gut ausgeprägt zu sein, obgleich die Verflüssigung nicht in solcher Schnelligkeit vor sich geht. Es ist indessen zu bemerken, daß die Konstanz, in Prozenten ausgedrückt, beim Vergleiche der verschiedenen Wassersorten nicht sehr gut ist. Folgende Tabelle zeigt die Resultate von Kulturen auf verschiedenen Mischungen von Gelatine und Agar.

Prozent Agar Prozent Gelatine	0 100	5 95	25 75	50 50	75 25	95 5	100 0
Abwässer	94	82	100	63	71	66	56
Filtrierte Abwässer	100	79	85	66	78	67	54
Merrimackfluß	82	80	100	43	70	70	54
Filtriertes Wasser	75	73	71	66	64	61	100
Total	98	88	100	67	79	74	79

Wirkung verschiedener Zusammensetzung der Nährböden.

Um den Einfluß, den eine variierte Zusammensetzung der Nährböden auf die Wirkung hat, zu prüfen, haben wir 11 verschiedene Nährböden neben unserer gewöhnlichen Gelatine und Agar beobachtet. Bei diesen Beobachtungen fanden wir, daß bei einer Reduktion der Anzahl der üblichen Komponenten Nährböden erzielt werden, die bedeutend höhere Zahlen ergeben. Leider ist es aber für die Erzielung der höchsten Zahlen nicht dasselbe, ob man einen bestimmten Bestandteil bei Nährmischungen mit Gelatinegrundlage oder bei solchen mit Agargrundlage wegläßt. Beim Gelatinenährboden ist das Weglassen des Peptons am vorteilhaftesten, während beim Agarnährboden die besten Wirkungen durch Weglassen von Fleischbrühe erzielt werden. Wenn man Pepton oder Pepton und Fleischbrühe beim Agarnährboden und Fleischbrühe beim Gelatinenährboden wegläßt, so erhält man höhere Zahlen, als bei der Standardgelatine und beim regulären Agar.

Um die Löslichkeit des Peptons zu erhöhen, fügte man den gewöhnlichen Nährböden Kochsalz zu. Wir haben jedoch niemals Schwierigkeiten gehabt, Pepton in Fleischbrühe oder Wasser aufzulösen, und die Feststellungen aller Beobachter stimmen darin überein, daß das Weglassen des Salzes einen besseren Nährboden ergiebt. In der Versuchsstation Lawrence wird schon seit einigen Jahren der Agarnährboden ohne Zusatz von Salz hergestellt; beim Gelatinenährboden aber ist, um Uebereinstimmung mit den Gepflogenheiten anderer Untersuchungsstellen zu wahren, Salz weiter verwendet worden.

Im Vergleich zu den aus den üblichen Bestandteilen zusammengesetzten Nährböden, selbst unter Berücksichtigung der oben als vorteilhaft bezeichneten Aenderungen in der Komposition, ergiebt ein Nährboden aus Nährstoff Heyden — hergestellt durch einfaches Lösen des Nährstoffes in Wasser, Filtrieren und Sterilisieren in Reagiergläsern — Zahlen, deren Höhe gegenüber den mit dem bisherigen Materiale erzielten Ergebnissen geradezu erstaunlich ist.

Diesem Nährstoff irgend eine unserer gewöhnlichen Nährsubstanzen hinzuzufügen, ist eher schädlich als von Vorteil.

Dieses Präparat scheint das Problem eines Normalnährbodens für quantitative Untersuchungen zu lösen oder wenigstens einen Nährboden darzustellen, nach dem die Ergebnisse unserer gewöhnlichen Nährböden kontrolliert werden können.

Das Streben der allgemeinen öffentlichen Gesundheitspflege geht heute dahin, einen Nährboden zu finden, der die zur Abgabe eines Urteils über die Reinheit eines Wassers notwendige Zeit des Züchtens abkürzt. Die Maximalzahl wird bei dem Nährstoffnährboden aber erst nach dem 4. Tage, der bisher die Grenze bildete, beobachtet. Andererseits erhalten wir damit schon am 2. Tage Ergebnisse, die besser sind als die besten mit unseren gewöhnlichen Nährböden in 3 oder 4 Tagen erzielten. Was diesen Punkt der 2-tägigen Zählung angeht, so möchten wir auch auf die Aehnlichkeit hinweisen, die zwischen den Zahlen des 2. Tages bei Peptonagar und Bouillongelatine und denen des 4. Tages bei Standardgelatine besteht. In der folgenden Tabelle sind die Ergebnisse mit den verschiedenen Nährböden bei täglicher Zählung verzeichnet:

Tabelle, die in Prozenten die Zahl der Bakterien ausdrückt, die sich auf Nährböden von verschiedener Zusammensetzung entwickeln.

Nährboden	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9. Tag
Nährstoffagar	19	60	78	85	95	99	99	100
Nährstoffpeptonagar	10	22	26	28	30	30	30	30
Peptonagar	11	16	22	23	24	24	24	24
Bouillonagar	8	13	16	17	17	17	17	17
Agar ohne Zusatz	8	10	13	14	14	14	14	14
Regulärer Agar	7	9	11	11	11	11	11	11
Nährstoffglycerinagar	6	10	11	11	11	11	11	11
Nährstoffbouillonagar	7	7	8	8	10	10	10	10
Bouillongelatine	12	19	24	26	26	26	26	26
Peptongelatine	7	12	18	20	20	20	20	20
Standardgelatine	8	10	11	12	13	13	13	13
Gelatine ohne Zusatz	1	6	12	13	13	13	13	13
Nährstoffgelatine	5	6	9	11	13	13	13	13

Beständigkeit bei verschiedenen Wasserarten.

Um die Verschiedenheit der Zahlen bei verschiedenen Wasserarten vor Augen zu führen, haben wir in einer besonderen Aufstellung einige der in vorstehender Tabelle enthaltenen Ergebnisse daraufhin verglichen. Da aber eine alle von uns untersuchten Nährböden enthaltende Tabelle für diesen Raum zu groß sein würde, haben wir den Vergleich auf regulären Agar und Nährstoffagar beschränkt.

An dieser Gegenüberstellung sieht man, daß bei dem neuen Nährboden die Zahlenzunahme schwankt zwischen einer 16-fachen bei reinem Grundwasser und einer kaum 2-fachen bei Abwässern. Beim Vergleich

anderer Nährböden haben wir gefunden, daß das Verhältnis bei den einzelnen ein ganz verschiedenes ist: einige geben bei Grundwasser die höchsten Zahlen, andere bei filtriertem Wasser etc. In jedem Falle aber hat Nährstoffagar mehr Kolonieen, als irgend ein anderer Nährboden.

Folgende Tabelle zeigt die Unregelmäßigkeit in dem Verhältnis der sich auf regulärem Agar entwickelnden Bakterien im Vergleich mit Nährstoffagar.

Tabelle, die in Prozenten die Bakterienentwickelung auf regulärem Agar und auf Nährstoffagar bei verschiedenen Wasserarten angiebt.

Wasserart	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8. Tag
			Regulärer Agar				
Grundwasser	0	5	6	6	6	6	6
Filtriertes Wasser	6	7	7	7	7	7	7
Merrimackfluß	6	7	7	8	8	9	9
Filtrierte Abwässer	14	17	18	19	19	19	19
Abwässer	34	44	46	46	46	46	46
			Nährstoffagar				
Grundwasser	6	43	78	88	93	100	100
Filtriertes Wasser	37	69	80	92	98	100	100
Merrimackfluß	29	78	93	97	97	99	100
Filtrierte Abwässer	26	65	93	95	97	99	100
Abwässer	39	75	95	100	100	100	100

Schlußfolgerung.

Aus den in den Tabellen verzeichneten Resultaten ergiebt sich unseres Erachtens, daß Nährstoffagar bei aller quantitativen Arbeit jedem anderen von uns untersuchten Nährboden vorzuziehen ist. Bei allen Wasserarten, die wir benutzten, haben wir gefunden, daß er größere und daher dem thatsächlichen Bakteriengehalte des Wassers näher kommende Zahlen ergiebt als irgend ein anderer der uns bekannten Nährböden.

Nährstoff Heyden ist, soviel wir wissen, eine reine, aus Hühnereiweiß hergestellte Albumose und bei seiner etwas komplizierten Zusammensetzung weniger Veränderungen ausgesetzt, als unsere gewöhnliche Fleischbrühe, Pepton oder Gelatine.

Dies ist entschieden ein Vorteil, da wir dadurch in den Stand gesetzt werden, einen Nährboden von gleichförmiger Zusammensetzung herzustellen und auf diese Weise der Vergleich von an verschiedenen Untersuchungsstellen gewonnenen Versuchsergebnissen ermöglicht wird.

Ueber den Grund, weshalb mit diesem Nährboden so viel höhere Zahlen erreicht werden, haben wir uns noch kein bestimmtes Urteil bilden können. Muller kommt bei seinen diesbezüglichen Untersuchungen zu dem Schlusse, daß die Vermehrung so zu erklären ist, daß gewisse Arten von Bakterien, die in dem gewöhnlichen Nährboden nicht fortkommen, in diesem gedeihen. In diesem Punkte stimmen wir ihm bei, aber wir glauben ferner, daß schwächere Einzelbakterien, die nicht Lebenskraft genug haben, um in gewöhnlichen Nährböden Kolonieen hervorzubringen, imstande sind, sich in dem neuen Nährboden langsam zu entwickeln. Dies würde gewissermaßen auch die Länge der Zeit erklären, die bis zur Erreichung der Maximalzahlen nötig ist. Unter-

suchungen, mit denen wir jetzt beschäftigt sind, werden uns hoffentlich in den Stand setzen, in nächster Zukunft mehr Licht in diese Frage zu bringen.

Zum Schlusse erlauben wir uns noch, Herrn Medizinalrat Dr. W. Hesse für viele, bei unseren Versuchen wertvolle Fingerzeige unseren Dank auszusprechen.

Litteratur.

Fuller, Journ. Amer. public health assoc. 1895. Oct. p. 381.
Sedgwick and Prescott, ibid. p. 450.
Hesse u. Niedner, Zeitschr. f. Hyg. etc. 1898. p. 29.
Muller, Arch. f. Hyg. Bd. XXXVIII. p. 350.

Beitrag zum tinktoriellen Verhalten des Bact. pestis.

[Aus dem staatlichen serotherapeutischen Institute in Wien (Vorstand: Prof. R. Paltauf).]

Von Dr. **E. Horniker.**

Das Bact. pestis zeichnet sich morphologisch durch zwei Eigentümlichkeiten aus, welche es oft schon allein gestatten, beim Anblick eines Deckglaspräparates von Blut oder Organsäften den Verdacht auf die zu Grunde liegende Erkrankung auszusprechen und die Untersuchung in eine bestimmte Richtung zu lenken. Diese beiden Merkmale sind die Polfärbung und die Bildung typischer Involutionsformen unter allen Lebensbedingungen in mehr oder minder reichlicher Anzahl.

Was die Polfärbung anbelangt, so zeigt schon die Thatsache, daß für die Darstellung derselben so viele Methoden angegeben werden, daß sie nicht immer konstant vorhanden ist oder nur bei bestimmter Behandlung der Präparate hervortritt. Allgemein anerkannt wird, daß die Polfärbung an Ausstrichen aus Organen und Blut bei der üblichen Färbung mit wässerigen Lösungen von Anilinfarben am leichtesten zu erzielen ist; schwieriger schon ist die Darstellung der Polfärbung an aus Kulturen entnommenen Bacillen. Verfahren dafür sind fast von allen Autoren angegeben worden, die sich mit dem Studium der Pest beschäftigt haben.

So empfiehlt die deutsche, zum Studium der Pest 1897 nach Indien entsandte Kommission zur Erzielung einer distinkten Polfärbung die Vorbehandlung der Deckglastrockenpräparate mit 0,5-proz. Essigsäure durch $^{1}/_{2}$ Minute und nachheriger Färbung mit schwachen wässerigen Lösungen von Methylenblau, ferner verdünnte Ziehl'sche Lösung. In der Anleitung für bakteriologische Feststellung der Pestfälle (Anleitung 3 der durch Beschluß des Bundesrates vom 4. Oktober 1900 festgelegten Grundsätze, die bei der Bekämpfung der Pest zu beobachten sind) wird Fixierung der lufttrockenen Deckglaspräparate durch 25 Minuten und nachherige Färbung mit verdünnten wässerigen Anilinfarblösungen empfohlen. Eine allgemein gerühmte Modifikation ist die von Sobernheim angegebene Fixierung der lufttrockenen Deckglaspräparate für 1 Minute in absolutem Alkohol, Verdunstenlassen desselben

in der Nähe der Flamme (das Abbrennen des Alkohols ist nicht zu empfehlen, weil die Deckgläschen oft dabei springen) und nachheriger Färbung mit verdünnter wässeriger Methylenblaulösung.

Dieses Verfahren ist auch von Kolle (Zeitschr. f. Hyg. Bd. XXXVI. Heft 3) besonders empfohlen und liefert in der That, wenn nicht zu lange gefärbt wird, schöne Bilder.

Gottschlich (Pestepidemie in Alexandrien 1899. Zeitschr. f. Hyg. Bd. XXXV. 1900. Heft 2) empfiehlt momentane Färbung mit Karbolfuchsin und sofortige Abspülung mit Wasser, Zobolotny (Ref. im Centralbl. f. Bakt. etc. Abt. I. Bd. XXVIII. 1900. p. 25) bedient sich der Färbung mittels einer Eosin-Methylenblaumischung nach vorausgegangener Fixierung der Präparate in Aetheralkohol oder Alcohol. abs. Die Polfärbung beim Bact. pestis beruht auf einer Anhäufung von euchromatischer Substanz an seinen beiden Enden, während die Mitte des Stäbchens dem Eindringen des Farbstoffes eine relative Resistenz darbietet. Daß diese Resistenz nur eine relative ist, ersieht man daraus, daß bei länger dauernder Färbung mit verdünnten wässerigen Lösungen oder bei Anwendung von wässerigen Lösungen stärkerer Konzentration auch an Ausstrichpräparaten, die aus pestbacillenhaltigen Organen und Blut angefertigt sind und die bei vorsichtiger Färbung sonst Polfärbung aufweisen, der ganze Bacillenleib gleichmäßig tingiert erscheint. Diese gleichmäßige Aufnahme des Farbstoffes zeigt der Bacillenkörper meistens auch, wenn er aus Kulturen entnommen wird, und da gelingt es nur bei bestimmten Verfahren, diese relative Resistenz des mittleren Teiles des Bacillenleibes gegenüber Farbstoffen zur Sichtbarkeit zu bringen.

Wenn wir diese Verfahren überblicken, so haben die meisten das Gemeinsame, daß das Deckglaspräparat einer Vorbehandlung mit entfärbenden Substanzen, wie Essigsäure, Alkohol, unterworfen wird, durch deren Aufnahme der Bacillenleib befähigt wird, sich langsamer mit der darauffolgenden verdünnten Farbstofflösung zu imbibieren, und bei diesem langsameren Verlaufe der Färbung kommt dann der Unterschied in dem graduell verschiedenen färberischen Verhalten des mittleren Teiles des Bacillenleibes gegenüber den beiden Enden eher zur Geltung, als bei sofortiger Imbibition mit wässerigen Lösungen ohne diese Vorbehandlung. Bei der Färbung mit Karbolfuchsin dürfte die Kürze der Zeit, während der das Präparat dem Farbstoff ausgesetzt ist, einen Einfluß in demselben Sinne ausüben.

Ich möchte nun darauf hinweisen, daß man die Wirkung von Alkohol und Farbstoff miteinander vereinen kann, indem man das lufttrockene, in der Flamme fixierte oder auch nicht fixierte Deckglaspräparat mit alkoholischen Lösungen von Anilinfarbstoffen durch $1^1/_2$ bis 2 Minuten behandelt, man erzielt damit auch aus Agar- und Bouillonkulturen ebensolche Polfärbung, wie durch die oben angeführten Methoden. Man kann sich für die Färbung auch der Stammlösungen bedienen, wenn dieselben längere Zeit gestanden haben, denn dann enthalten sie keinen absoluten Alkohol mehr. Frische, in absolutem Alkohol hergestellte Lösungen haben nämlich, wie Günther nachgewiesen hat, gar keine Färbekraft, sie färben nur im Momente der Wasserabspülung des Präparates. Die gewöhnlich benutzten Stammlösungen haben nach öfterem Gebrauche bloß einen Alkohol von 90 oder 85 Proz. und eignen sich für diese Färbung ausgezeichnet, man erzielt nach $1^1/_2$ bis 2 Minuten langer Einwirkung sehr distinkte Polfärbung, auch

kommen die sogenannten Involutionsformen dabei sehr schön zur Geltung, eine Ueberfärbung der Präparate ist nicht so leicht möglich, was besonders dann in Betracht kommt, wenn man nur wenig Material zur Untersuchung hat.

Die Färbung wird derart vorgenommen, daß man auf das lufttrockene, in der Flamme fixierte Deckglaspräparat einige Tropfen einer konzentrierten alkoholischen Farbstofflösung aufträufelt, durch Hin- und Herbewegen für eine gleichmäßige Verteilung derselben sorgt und nach $1^1/_2$—2 Minuten kurz in Wasser abspült. Die schönsten Bilder liefert Methylenblau und Gentianaviolett, letztere Farbe ist besonders bei Untersuchung von Blut auf Pestbacillen zu empfehlen; es erscheinen nämlich bei Behandlung mit dieser Farblösung die roten Blutkörperchen blaßviolett, die Polenden der Pestbacillen infolge der Metachromasie rötlich gefärbt, so daß selbst bei Vorhandensein weniger Bacillen im Präparate dieselben sofort in die Augen fallen, weil sie sich von einem Hintergrunde von Blutkörperchen, selbst in etwas dickerer Schicht, durch ihren rötlichen Ton gut abheben.

Inhalt.

Originalmitteilungen.

Frommannsche Buchdruckerei (Hermann Pohle) in Jena.

CENTRALBLATT

für

Bakteriologie, Parasitenkunde und Infektionskrankheiten

Erste Abteilung:

Mediz.-hygien. Bakteriologie u. tier. Parasitenkunde

Originale

In Verbindung mit

Geh. Med.-Rat Prof. Dr. Loeffler, Prof. Dr. R. Pfeiffer, Prof. Dr. M. Braun
Greifswald Königsberg i. Pr.

herausgegeben von

Dr. O. Uhlworm in Berlin W., Schaperstr. 2/3 I

Verlag von Gustav Fischer in Jena

XXXII. Band. — Jena, den 13. Dezember 1902. — No. 13.

Preis für den Band (50 Bogen) 15 Mark. — Die Nummern erscheinen zwanglos je nach dem vorliegenden Stoffe.

Inhaltsverzeichnis.

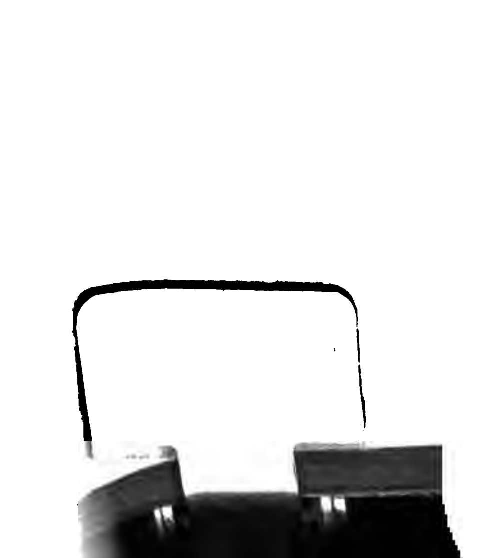
I. Verzeichnis der in Band XXXII enthaltenden Arbeiten.

II. Namen- und Sachverzeichnis.

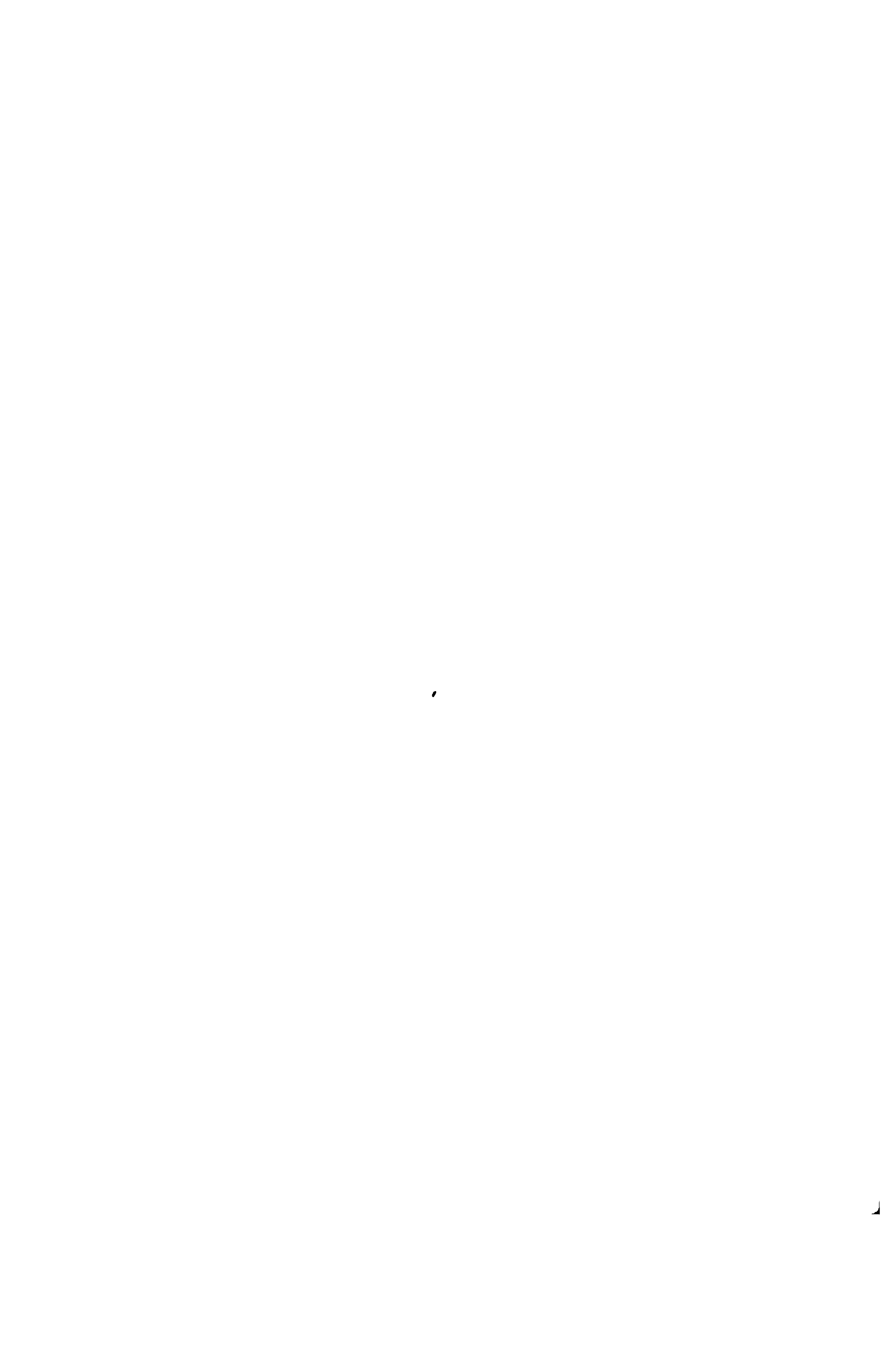
III. Verzeichnis der Abbildungen.

Frommannsche Buchdruckerei (Hermann Pohle) in Jena.

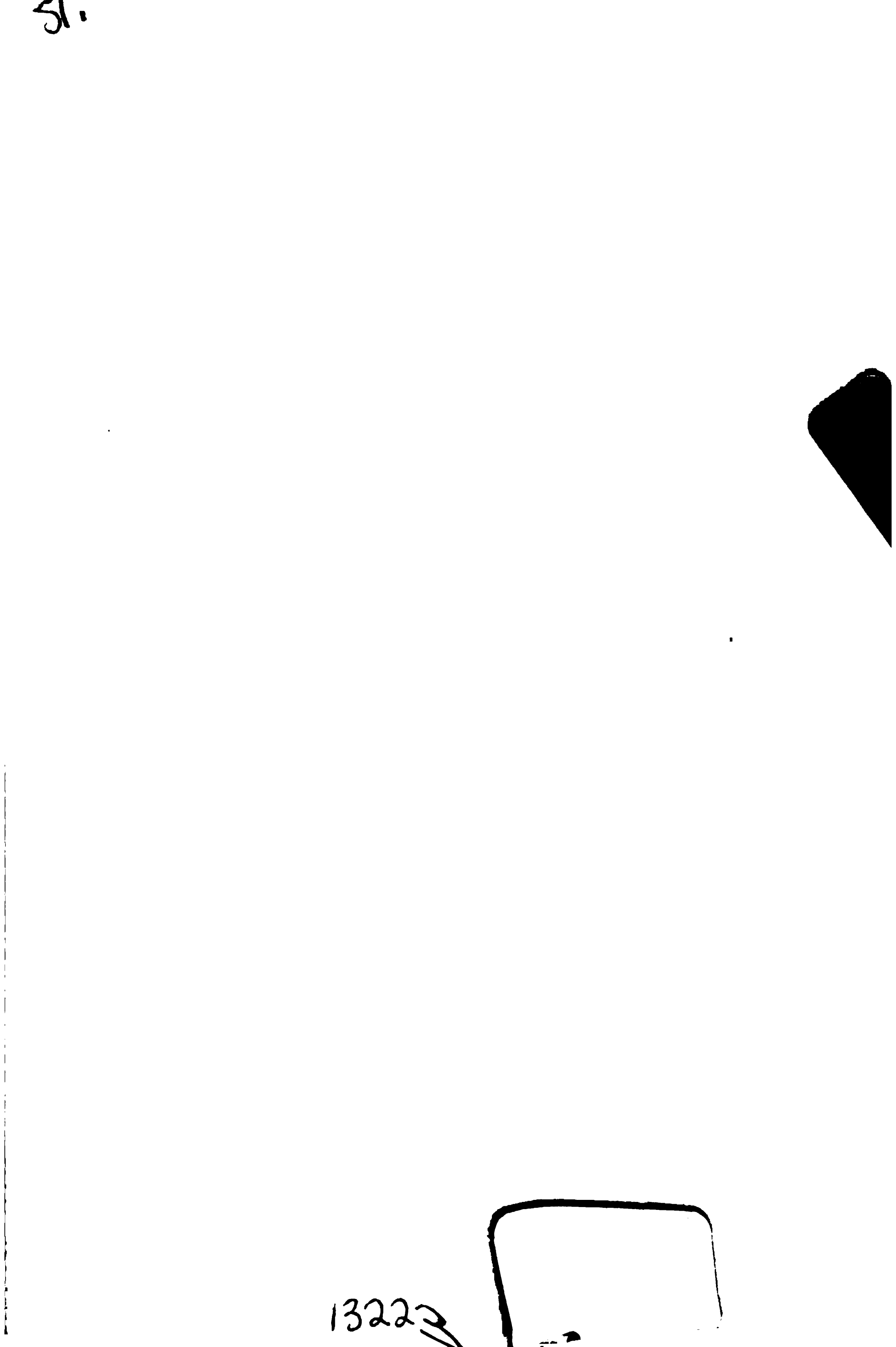












51.
13223

